

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Détection et identification simultanées de l'espèce et du caractère pathogène de trois vibrios par hybridation sur damier à ADN

Desmet, Déborah

Award date:
2006

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**DETECTION ET IDENTIFICATION SIMULTANÉES DE L'ESPECE ET DU
CARACTERE PATHOGENE DE TROIS VIBRIOS PAR HYBRIDATION SUR
DAMIER A ADN**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Déborah DESMET

Juin 2006

**Détection et identification simultanées de l'espèce et du caractère pathogène
de trois *Vibrios* par hybridation sur damier à ADN**

DESMET Déborah

Résumé

Les *Vibrio* sont des bactéries pathogènes que l'on rencontre fréquemment dans les fruits de mer et qui peuvent provoquer des symptômes plus ou moins graves lorsqu'ils sont consommés. Afin de s'assurer de leur absence dans les produits commercialisés, les industries alimentaires ont tout intérêt à disposer d'un outil permettant la détection et l'identification spécifique de ces microorganismes. Il est également intéressant de disposer d'une approche permettant de préciser le caractère virulent des différentes espèces potentiellement présentes.

La technologie des damiers à ADN appliquée dans ce contexte apporte un certain nombre d'avantages. Il s'agit en effet d'un outil rapide, spécifique et sensible, engendrant un gain de temps considérable, et par conséquent une plus grande efficacité en comparaison des méthodes classiquement utilisées.

Nous avons donc développé une puce à ADN permettant la détection et l'identification de trois espèces de *Vibrio*, à savoir *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. De plus, la présence de sondes de détection de marqueurs de virulences spécifiques à chaque espèce permet l'obtention d'informations quant au caractère virulent de ces trois pathogènes. L'application de ce damier comme outil de détection sur des échantillons alimentaires au niveau industriel pourrait à l'avenir permettre une diminution de l'incidence des *Vibrio* pathogènes.

Remerciements

Il y a tant de personnes qui m'ont soutenue pendant ce mémoire et pendant ces quatre années d'études. J'ai peur d'en oublier, alors ... merci à tous !

Je voudrais vous remercier tout particulièrement, monsieur Remacle, pour m'avoir acceptée dans votre équipe et pour la confiance que vous m'avez accordée. J'espère avoir répondu à vos attentes. Je n'attendais pas un meilleur endroit que ce laboratoire de haute compétence pour réaliser mon mémoire, aboutissement de mes études.

Merci également à vous, la "bande des biochips" pour votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur. Merci Jon pour tout ce que tu m'as appris, pour ta patience et ton aide appréciables. Un clin d'œil également à Marc. Dieu que ton aide m'a été précieuse en cette période de rédaction et d'impression, instant très critique pour nous, mémorants stressés et incultes en informatique.

En parlant d'informatique, je tiens à te dire, grand frère, à quel point j'ai apprécié ton investissement dans mon travail. Plus que pour la "frime" d'avoir de belles images, ton intérêt et ton implication m'ont particulièrement touchés ... Il ne reste plus qu'à animer tout ça (hihi)

Maman, papa, je vous dédie ce mémoire, vous l'avez bien mérité. Je n'y serais pas arrivée sans la confiance que vous avez mise en moi, votre patience et votre persévérance. Je vous ai fait traversé des moments de galère, je m'en excuse, mais la fin du voyage en valait la peine, je pense.

Tant qu'on est dans la famille, je fais une petite place, quand même, à Mewing et Perrad. Si vous saviez à quel point je me régale de ces moments de grand réconfort moustachus et pattes de velours.

Je n'oublie pas bien sûr tous mes amis. Vous êtes trop nombreux pour tous vous citer, mais je tiens à remercier plus particulièrement Julien, mon "grand frère bio", pour tout, tout simplement. Merci aussi Emma, je n'oublierai pas ces magnifiques soirées en ta compagnie à la fac. Merci Auré, pour ta bonne humeur, tes petits messages et tous ces petits détails qui changent tout. Quant à toi, JJ, j'espère vraiment qu'on se retrouvera l'année prochaine, pour plein d'autres anecdotes. Merci à tous les autres qui ont été là quand ça n'allait pas, qui m'ont fait rire et qui ont mis de la bonne humeur dans notre travail.

Je réserve bien entendu le meilleur pour la fin. Un énorme merci à toi, Sophie, sans qui je n'aurais jamais pu réaliser ce mémoire. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour le temps que tu m'as consacré (désolée de t'avoir fais loupé le badminton et un week-end au soleil). Même si "c'est ton travail", comme tu me l'as dit, j'ai quand même l'impression d'avoir été énormément chouchoutée. Je te dois beaucoup. Je le redis une dernière fois, merci.

Liste des abréviations

A	Adénine
ADH	Alcohol De-Hydrogenase
ADN	Acide Desoxyribonucléique
ADP	Adenosine Diphosphate
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adenosine Triphosphate
BRCA	Breast Cancer Gene
BTP	BromoThymol Blue
C	Cytosine
cAMP	Adenosine Monophosphate Cyclique
cfu	colony forming unit
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
dATP	Deoxyadenosine Triphosphate
dCTP	Deoxycytosine Triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine Triphosphate
dTTP	Deoxythymidine Triphosphate
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate
EAT	Eppendorf Array Technology
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
G	Guanine
LDC	Lysine Decarboxylase
MAAC	Modified Arabinose Ammonium sulfate Chlorate
MAGE	Melanoma AntiGen
MN	Leucocyte Mononucléaire
NAD+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
ODC	Ornithine Decarboxylase
ONPG	O-Nitrophenyl-B-D-Galactopyranoside
ORF	Open Reading Frame
pb	paires de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Point isoélectrique
PMN	Polymorphonucléaire
rpm	rotations par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
spp	Espèce
T	Thymidine
TBE	Tris Borate EDTA
TCBS	Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose
Tm	"melting temperature"
U	Uracile
UNG	Uracile DNA Glycosylase
UV	Ultraviolets
Vp-TDH	Protéine "Thermostable Direct Hemolysin"
Vp-TRH	Protéine "Thermostable Direct Hemolysin Related Hemolysin"
WB	Washing Buffer

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>1. Avant-propos</u>	1
<u>2. Le genre <i>Vibrio</i></u>	2
<u>2.1 Caractères généraux du genre <i>Vibrio</i></u>	2
<u>2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i></u>	3
2.2.1 Caractères bactériologiques.....	3
2.2.2 Pathogénicité	4
2.2.2.1 <i>Thermostable direct haemolysin : Vp-TDH</i>	4
2.2.2.2 <i>Thermostable direct haemolysin related haemolysin : Vp-TRH</i>	5
<u>2.3 <i>Vibrio vulnificus</i></u>	5
2.3.1 Caractères bactériologiques.....	5
2.3.2 Pathogénicité	5
2.3.2.1 <i>Sidérophores</i>	6
2.3.2.2 <i>Hémolysine/cytolysine</i>	6
<u>2.4 <i>Vibrio cholerae</i></u>	6
2.4.1 Caractères bactériologiques.....	6
2.4.2 Pathogénicité	7
2.4.2.1 <i>Toxine cholérique</i>	7
2.4.2.2 <i>Hémolysine</i>	7
<u>3. Méthodes de détection et d'identification des <i>Vibrios</i></u>	8
<u>4. Gyrase</u>	9
<u>5. Les biochips</u>	10
<u>5.1 Introduction</u>	10
<u>5.2 Principe d'hybridation</u>	10
5.2.1 Hybridation moléculaire.....	10
5.2.2 Paramètres influençant le taux d'hybridation	10
<u>5.3 Conception d'un damier à ADN</u>	12
5.3.1 Choix du support	12
5.3.2 Fixation des ADN trappeurs.....	12
5.3.3 Méthode d'attachement des sondes au support.....	13
<u>5.4 Techniques de détection</u>	13
<u>5.5 Applications</u>	15
5.5.1 Damiers à expression de gènes.....	15
5.5.2 Damiers "génomiques"	15

<u>OBJECTIF</u>	17
------------------------------	----

<u>MATERIEL ET METHODES</u>	18
--	----

<u>1. Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>	18
<u>2. Electrophorèse sur gel d'agarose</u>	20
<u>3. Purification des produits PCR après migration sur gel d'agarose 1 %</u>	21
<u>4. Séquençage</u>	22
<u>5. Fixation des ADN trappeurs sur lames fonctionnalisées</u>	23
<u>6. Hybridation des produits PCR biotinylés sur biochips et révélation par une coloration à l'argent</u>	25

<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	27
---	----

<u>1. Mise au point des paramètres de la PCR d'identification des espèces et de la PCR de virulence</u>	27
--	----

<u>1.1 Choix des gènes cibles</u>	27
--	----

1.1.1 Gène cible d'identification de l'espèce.	27
---	----

1.1.2 Gènes cibles de détection de virulence.....	27
---	----

<u>1.2 Constitution d'une banque génomique</u>	28
---	----

<u>1.3 Mise au point des paramètres des deux PCR</u>	28
---	----

1.3.1 Sélection des amorces	28
-----------------------------------	----

1.3.1.1. Amorces consensus.....	29
---------------------------------	----

1.3.1.2. Amorces de virulence	29
-------------------------------------	----

1.3.2 Optimisation des conditions PCR	30
---	----

<u>1.4 Amplification des gènes cibles</u>	31
--	----

1.4.1 Amplification du marqueur gyrase.....	31
---	----

1.4.2 Amplification des marqueurs de virulence.....	32
---	----

1.4.2.1 PCR simplexe	32
----------------------------	----

1.4.2.2 PCR multiplexe.....	32
-----------------------------	----

<u>2. Élaboration de la biochips permettant la détection des trois espèces <i>Vibrio</i> et de leur caractère virulent</u>	34
---	----

<u>2.1 Sélection des sondes de captures spécifiques</u>	34
--	----

2.1.1	Détection de l'espèce : gyrase.....	34
2.1.2	Détection de la virulence.....	35
2.2	<u>Design de la biochips</u>	36
2.3	<u>Détection des ADN cibles par hybridation</u>	37
2.3.1	Hybridation sur damier des espèces d'intérêt.....	37
2.3.1.1	<i>Vibrio cholerae</i>	37
2.3.1.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	38
2.3.1.3	<i>Vibrio vulnificus</i>	38
2.3.2	Essais préliminaires d'hybridation d'espèces non ciblées de la famille des <i>Vibrionacées</i>	39
2.4	<u>Etude de l'effet de la stringence de différents lavages post- hybridation</u>	40
2.5	<u>Test de sensibilité de la biochips pour les trois espèces <i>Vibrio</i></u>	41
2.5.1	<i>V. cholerae</i>	41
2.5.2	<i>V. parahaemolyticus</i>	41
2.5.3	<i>V. vulnificus</i>	41
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>		43
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		47

Introduction

Virus	Bactéries	Parasites
Calicivirus humains	<i>Vibrio</i> spp	Nématodes
Norovirus	<i>V.parahaemolyticus</i>	Trématodes
Sapporo virus	<i>V.cholerae</i>	Cestodes
Virus de l'hépatite A	<i>V.vulnificus</i>	Protozoaires
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Clostridium botulinum</i>	
	<i>Campylobacter</i> spp	
	Streptococcus groupe A	

Table 1 – Causes infectieuses des maladies liées aux fruits de mer (Butt *et al.*, 2004 (1))

1. Avant-propos

Les affections alimentaires sont une cause majeure de morbidité et d'hospitalisation. Il est difficile d'estimer l'incidence mondiale, mais on a pu compter, en 2000, le décès de 2,1 millions de personnes à la suite d'affections diarrhéiques, la plupart provenant de la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (Organisation Mondiale de la Santé : www.who.int). Pour citer un exemple, chaque année, ces infections concernent environ 76 millions de personnes aux Etats-Unis, entraînant 325 000 hospitalisations et 5000 décès. Parmi ces cas, 10 à 19% des infections impliquent la consommation de fruits de mer (plus de 63,5 millions de tonnes par an) et de poissons. Le pourcentage de maladies alimentaires liées aux fruits de mer est plus élevé dans les pays qui en consomment beaucoup (typiquement en bord de mer), ainsi que dans les pays consommant traditionnellement ces aliments crus.

Dans ce contexte, le terme "fruits de mer" inclut les mollusques (huîtres, moules, coquillages, palourdes), les crustacés (crabes, crevettes, ...) ainsi que les poissons. Cependant, les poissons sont moins souvent source de contamination. Ils sont généralement consommés cuits, contrairement aux coquillages plus fréquemment consommés crus ou partiellement cuits, augmentant ainsi les risques d'infection. De plus, les fruits de mer, connus pour leur capacité à filtrer de grandes quantités d'eau pour se nourrir, concentrent les particules présentes dans l'eau environnante et peuvent accumuler les microorganismes infectieux en très grand nombre aussi bien dans leur intestin que dans leurs tissus (Butt *et al.*, 2004 (1)).

Trois grandes catégories de pathogènes sont à la source des infections liées aux fruits de mers : les virus, les bactéries et les parasites (Table 1).

Les virus les plus fréquemment rencontrés sont le norovirus et le virus de l'hépatite A. Ils se transmettent par voie oro-fécale, via l'eau ou la nourriture contaminées.

Les principaux parasites responsables d'infections liées aux fruits de mer incluent les nématodes, les trématodes, les cestodes et les protozoaires

Parmi les bactéries, les membres de la famille des *Vibrionaceae* font partie des agents infectieux les plus fréquemment rencontrés. En effet, 20% des infections bactériennes dues à la consommation de fruits de mer sont causées par des espèces de *Vibrio* (Butt *et al.*, 2004 (1); Butt *et al.*, 2004 (2)).

2. Le genre *Vibrio*

2.1 Caractères généraux du genre *Vibrio*

Le genre "*Vibrio*" fait partie de la famille des *Vibrionaceae*, qui réunit des bactéries Gram négatives, mobiles ou non, fermentant les glucides. Les *Vibrio* ont la forme de bâtonnets droits ou incurvés, présentant un diamètre de 0,5 à 1 µm et d'une longueur de 1,2 à 3,5 µm. Ils sont mobiles grâce à la présence d'un flagelle polaire, non sporulés, non luminescents, capsulés, aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentatif. Ils requièrent la présence d'ions sodium dans le milieu pour leur croissance et préfèrent des températures relativement élevées (autour de 20°C), ce qui explique une incidence plus importante pendant les mois les plus chauds (DePaola *et al.*, 2003). Ils sont positifs pour la réaction à l'oxydase, pour le test ornithine décarboxylase et pour la réduction des nitrates (Bergey *et al.*, 1984).

Ces organismes, communs et présents un peu partout dans le monde, font partie de la flore naturelle des milieux aquatiques, notamment les eaux des estuaires et les eaux côtières. Ils peuvent coloniser de nombreux organismes marins (poissons, mollusques, crustacés, zooplancton, algues, ...) qui sont alors source de contamination pour l'homme. Le genre *Vibrio* comprend onze espèces connues comme pathogènes humains pouvant être classifiées en deux groupes selon le type de maladie engendrée : les infections gastro-intestinales et les infections extra-intestinales (Table 2) (Honda *et al.*, 1993).

Maladie gastro-intestinale	Maladie extra-intestinale
<i>V.cholerae</i> O1 et non-O1	<i>V.vulnificus</i>
<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.alginolyticus</i>
<i>V.mimicus</i>	<i>V.damsela</i>
<i>V.hollisae</i>	<i>V.cincinnatiensis</i>
<i>V.fluvialis</i>	<i>V.metschnikovii</i>
<i>V.furnissii</i>	
<i>V.metschnikovii</i>	

Table 2 - Maladies causées par les espèces pathogéniques du genre *Vibrio* (Honda *et al.*, 1993)

Les trois espèces principalement responsables d'infection sont *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*. La dose infectieuse est variable d'une espèce à l'autre et pas toujours bien connue. Il semble qu'elle soit de 100 000 cfu (colony forming unit) par gramme pour *V.parahaemolyticus*, et environ 1000 cfu par gramme pour *V.vulnificus* (Butt *et al.*, 2004 (1)). Pour ce qui est de *V.cholerae*, la dose infectieuse est élevée, principalement à cause de la barrière que constitue l'acidité gastrique. Chez des individus sans facteur de risque, une dose de 10^8 cfu entraîne une diarrhée banale, se développant en un choléra grave à partir de 10^{11} cfu.

Plusieurs espèces de *Vibrio* ont été impliquées dans des toxi-infections liées aux fruits de mer à travers le monde, *V.parahaemolyticus* étant l'espèce la plus commune, suivie de *V.vulnificus* et *V.cholerae* non épidémique (Table 3).

Caractéristiques biochimiques des <i>Vibrios</i>			
Test	Réaction		
	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>	<i>V.cholerae</i>
Indole	+		
LDC	+		
ODC	+		
Réduction nitrate	+		
Gélatinase	+		
Motilité	+		
Fermentation maltose	+		
Fermentation D-xylose	-		
ADH	-		
Phénylalanine désaminase	-		
Fermentation myoinositol	-		
Fermentation L-sorbitol	-		
Uréase	-		
Fermentation L-Arabinose	+	-	
ONPG (o-Nitrophenyl-B-D-galactopyranoside)	-	+	
Voges-Proskauer (VP)	-		+
Fermentation saccharose	-		+
Fermentation D-mannitol	+	+/-	+
Fermentation cellobiose	-	+	-
Fermentation lactose	-	+	-
Fermentation saliciline	-	+	-
NaCl 0%	-		+
NaCl 3%	+		
NaCl 10%	-		

Table 4 – Caractéristiques biochimiques des *Vibrios* (Bergey *et al.*, 1984)

Organisme	Transmission	Maladie
<i>V.parahaemolyticus</i>	Alimentaire	Gastroentérite Infection de plaie Septicémie
<i>V.vulnificus</i>	Alimentaire Contact	Gastroentérite Septicémie Infection de plaie
<i>V.cholerae</i>	Alimentaire Contact	Gastroentérite

Table 3 - Caractéristiques des trois principaux *Vibrio* (Butt *et al.*, 2004 (1))

Cependant, *V.vulnificus* est la principale cause de décès. Dans la plupart des cas, une infection par un *Vibrio* engendre une gastroentérite. Il est à noter qu'une septicémie peut également survenir suite à l'ingestion de fruits de mer contaminés ou lors d'infections de plaies par manipulation de fruits de mer, poissons, ... (Butt *et al.*, 2004 (1))

En conditions défavorables, les *Vibrio* sont capables d'entrer dans une phase viable non cultivable. Dans ce cas, ils ne sont donc plus détectables par des méthodes bactériologiques classiques. Par contre, si les conditions redeviennent optimales, les bactéries ont la faculté de revenir à leur état initial "normal" pouvant ainsi à nouveau être cultivées. Dès lors, ce phénomène explique que des échantillons environnementaux semblant négatifs lors de la détection soient en réalité contaminés (Oliver, 1995).

2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

2.2.1 Caractères bactériologiques

Classiquement, on identifie *V.parahaemolyticus* sur base des caractéristiques biochimiques suivantes : il est positif pour les tests arabinose et mannitol, et négatif pour les tests ONPG, cellobiose et sucrose (Kelly *et al.*, 1989). Les caractéristiques biochimiques sont résumées dans la table 4.

Comme la plupart des espèces du genre *Vibrio*, *V.parahaemolyticus* se développe sur de nombreux milieux de culture, pour autant qu'ils contiennent au moins 1% de NaCl. La bactérie est également capable de croître à des pH alcalins, caractéristique utilisée pour la réalisation de milieux sélectifs (Bergey *et al.*, 1984). Classiquement, plusieurs milieux peuvent être utilisés pour l'isolement de *V.parahaemolyticus*. On utilise par exemple les géloses TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose), bromothymol blue (BTP)-Teepol et MAAC Agar (Honda *et al.*, 1982).

Toxines
Hémolysines : 1. Thermostable direct haemolysin (Vp-TDH) 2. Vp-TDH related haemolysin (Vp-TRH) 3. Lecithin-dependent haemolysin (LDH) 4. Phospholipase A et C 5. δ VPH
Facteur CHO
Entérotoxine stable à la chaleur
Protéase
Facteur semblable à la toxine cholérique
Toxine sensible à la chaleur
Colonisation et invasion
Pili
Hémagglutinine
Adhésion aux cellules
Invasion

Table 5 - Facteurs de virulence de *V.parahaemolyticus* (Honda *et al.*, 1993)

2.2.2 Pathogénicité

V.parahaemolyticus produit plusieurs facteurs de virulence (table 5), dont cinq hémolysines. Parmi celles-ci, les plus connues et les mieux étudiées sont la "Thermostable Direct Haemolysin" (Vp-TDH) et la "Thermostable Direct Haemolysin Related Haemolysin" (Vp-TRH). Ces deux hémolysines sont des protéines de 165 acides aminés, avec une homologie de séquence de 67% (table 6).

Propriété	Vp-TDH	Vp-TRH
Poids moléculaire		
Toxine complète	45 kDa	47 kDa
Sous-unité	23 kDa	23 kDa
P.I.	4,9	4,6
Stabilité à la chaleur	Stable à 100°C	Labile à 60°C
Antigénicité	Similaire, mais pas identique	
Activités biologiques		
Activité hémolytique	Lapin, homme > veau, mouton > cheval	Veau, mouton > lapin, homme > cheval
Activité létale	Similaire	
Accumulation de fluides dans une boucle d'iléon de lapin	250 µg/boucle	100 µg/boucle

Table 6 – Comparaison des deux hémolysines Vp-TDH et Vp-TRH chez *V.parahaemolyticus*. (Selon Honda *et al.*, 1993)

En utilisant un milieu agar-sang salin, le milieu Wagatsuma, il est possible de mettre en évidence les caractéristiques hémolytiques de *V.parahaemolyticus* (phénomène Kanagawa). Sur base de ce test, deux types de souches ont été détectées : les souches hémolytiques et les souches non hémolytiques. Chez les souches hémolytiques, la protéine Vp-TDH a pu être identifiée et semble fortement liée aux maladies gastrointestinales.

Toutefois, il a été montré que des souches négatives pour le phénomène Kanagawa (non hémolytiques) peuvent également causer des gastroentérites. Ces souches ne produisent pas de quantités détectables de Vp-TDH, et sont négatives aux tests d'hybridation sur colonie pour le gène *tdh* (Nishibuchi *et al.*, 1985). Pourtant, elles provoquent des symptômes qui ne sont pas distinguables de ceux causés par Vp-TDH et peuvent aussi induire une accumulation de fluides. Une nouvelle toxine a ainsi pu être mise en évidence et identifiée comme étant la "Thermostable Direct Haemolysin Related Haemolysin" (Vp-TRH). Parmi les souches cliniques *tdh*-négatives, environ deux tiers possèdent le gène *trh* (Honda *et al.*, 1993).

2.2.2.1 Thermostable direct haemolysin : Vp-TDH

Cette toxine est une protéine dimérique d'environ 42 kDa composée de deux sous unités identiques. Comme son nom l'indique, elle est stable à une température de 100°C pendant 10 min. La toxine induit la formation de pores d'un diamètre de 2 nm qui consistent en des canaux chlorures activés par le calcium. Ceci induit un déséquilibre ionique (Raimondi *et al.*, 2000), entraînant une lyse osmotique des érythrocytes. En plus de son action sur les érythrocytes, Vp-TDH a une action cytolytique sur différents types cellulaires tels que les cellules HeLa, les cellules FL (follicular lymphoma) et les cellules de cœur de souris fœtales. Enfin, son activité entérotoxique a pu être démontrée et la toxine est considérée comme un

important facteur de virulence dans les gastroentérites liées à *V.parahaemolyticus* (Honda *et al.*, 1993).

Le gène codant pour cette toxine, *tdh*, est composé d'une ORF (Open Reading Frame) de 567pb (Honda *et al.*, 1993).

2.2.2.2 Thermostable direct haemolysin related haemolysin : Vp-TRH

La toxine, une protéine dimérique d'un poids moléculaire de 48 kDa, perd son activité lorsqu'elle est soumise à une température de 60°C pendant 10 minutes. Comme Vp-TDH, Vp-TRH est capable de lyser les érythrocytes. Son mécanisme d'action est semblable à celui décrit pour Vp-TDH. Ainsi, Vp-TRH induit des canaux chlorures activés par le calcium, ce qui entraîne un déséquilibre dans le flux ionique (Yeung *et al.*, 2004).

Le gène *trh*, codant pour la protéine Vp-TRH, est lui aussi composé de 567pb et présente une homologie de séquence de 68% avec le gène *tdh* (Honda *et al.*, 1993). Il existe parmi les différentes souches de *V.parahaemolyticus* des variants au niveau de la séquence nucléique, nommés *trh1* et *trh2*, présentant un pourcentage d'identité de 84% (Kishishita *et al.*, 1992).

2.3 *Vibrio vulnificus*

2.3.1 Caractères bactériologiques

V.vulnificus, pathogène opportuniste, est le *Vibrio* le plus dangereux. Il est la cause principale de décès suite à la consommation de fruits de mer aux Etats-Unis (Gulig *et al.*, 2005).

L'espèce regroupe des souches qui sont généralement classées en 3 biotypes : le biotype 1, pathogène pour l'homme, est présent tant dans les échantillons environnementaux que cliniques. Le biotype 2 est typiquement pathogène pour les anguilles, plus rarement pour l'homme. Le biotype 3 a été découvert lors d'une épidémie en Israël, suite à la manipulation de tilapias, et n'a été détecté nulle part ailleurs. Les tests biochimiques susceptibles d'identifier *V. vulnificus* sont décrit en table 4 : la bactérie est positive pour les tests cellobiose et lactose, et est sensible au O129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine). Elle pousse sur les milieux "MacConkey Agar", "Heart infusion medium" et TCBS Agar. (Chiang *et al.*, 2003)

2.3.2 Pathogénicité

Au niveau de la pathogénicité, *V.vulnificus* est caractérisé par une prolifération rapide et des dommages tissulaires extensifs au niveau de la peau. Il est également impliqué de façon plus modérée dans des cas de gastroentérites. Toute une série de facteurs contribue à la virulence de la bactérie : la présence d'une capsule polysaccharidique, la production de metalloprotéases, d'hémolysines/cytolysines extracellulaires, la capacité d'acquisition du fer, ...(Gulig *et al.*, 2005)

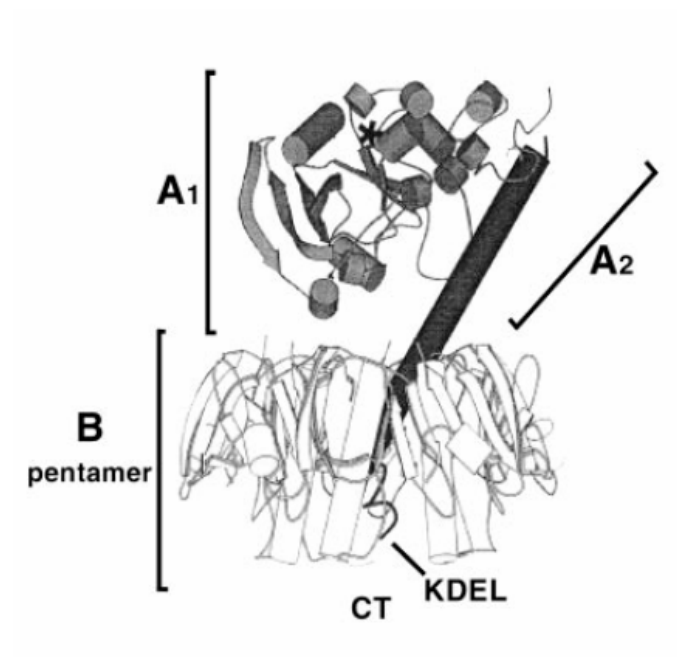


Figure 1 - Structure de la toxine cholérique (Lencer, 2001)

2.3.2.1 Sidérophores

La capacité d'acquérir le fer de l'hôte est primordiale pour la bactérie car il est essentiel à sa croissance. Bullen et al. (1991) ont pu montrer que chez les personnes atteintes d'hémochromatose (taux de fer sanguin élevé), la susceptibilité à l'infection par *Vibrio vulnificus* est plus importante. De même, sa croissance est favorisée si la saturation de la transferrine est plus élevée ou si de l'hématine (hématite synthétique) est ajoutée (Bullen *et al.*, 1991). Simpson et Oliver (1983) ont mis en évidence la production de deux sidérophores par *V.vulnificus* : les sidérophores phénolate et hydroxamate. Le sidérophore phénolate, codé par le gène *viuB* est un chélateur de faible poids moléculaire, capable de lier le fer à partir de la transferrine et de la lactoferrine et de le ramener à la cellule. Le fer est ensuite transporté à travers la paroi bactérienne par des systèmes de transport membranaires et libéré dans la cellule (Simpson *et al.*, 1983).

Selon certains auteurs, un taux élevé de fer pourrait influencer la pathogénicité de ces bactéries en inhibant leur phagocytose par les leucocytes mononucléaires (MN) et les polymorphonucléaires (PMN), ainsi que l'activité bactéricide des mononucléaires et la réponse chimotactique des PMN (van Asbeck *et al.*, 1984).

2.3.2.2 Hémolysine/cytolysine

Les activités cytotolytiques et hémolytiques de *Vibrio vulnificus* ont été largement décrites (Johnson *et al.*, 1981; Kreger *et al.*, 1981). Ces activités sont liées à la production d'une cytolysine, codée par le gène *vvhA* (Chiang *et al.*, 2003). Son rôle dans la virulence n'est pas encore bien établi : l'injection de la protéine purifiée chez une souris entraîne des dommages semblables à ceux produits par l'infection (Gray *et al.*, 1987), mais des souches mutées ne produisant pas la toxine ne diminuent pas en virulence (Wright *et al.*, 1991). La toxine produit des pores dans les membranes cellulaires par oligomérisation médiée par le cholestérol (Chiang *et al.*, 2003) et stimule la guanylate cyclase. L'augmentation de cGMP qui s'ensuit provoque une vasodilatation et un oedème (Kook *et al.*, 1996). Elle peut également induire l'apoptose par élévation du calcium intracellulaire libre et par génération d'anions superoxydes (Chiang *et al.*, 2003). Au niveau des cellules endothéliales, cette activité pourrait provoquer une vasodilatation et un œdème, caractéristiques de l'infection (Gulig *et al.*, 2005).

2.4 *Vibrio cholerae*

2.4.1 Caractères bactériologiques

V.cholerae se distingue des autres espèces par sa capacité de croître en absence de NaCl. De plus, il est positif au test de Voges-Proskauer, à l'utilisation du saccharose et du sucrose.

L'espèce *V.cholerae* contient plus de 70 sérotypes différents, classifiés sur base de l'antigène somatique O. Les sérotypes les plus prévalents, O1 et O139, produisent une entérotoxine thermolabile, la toxine cholérique. Ils ont la capacité de causer de grandes épidémies et sont responsables du cholera. Des études génétiques ont montré que le clone O139 est très proche du clone O1, suggérant une apparition par transfert horizontal (Byun *et*

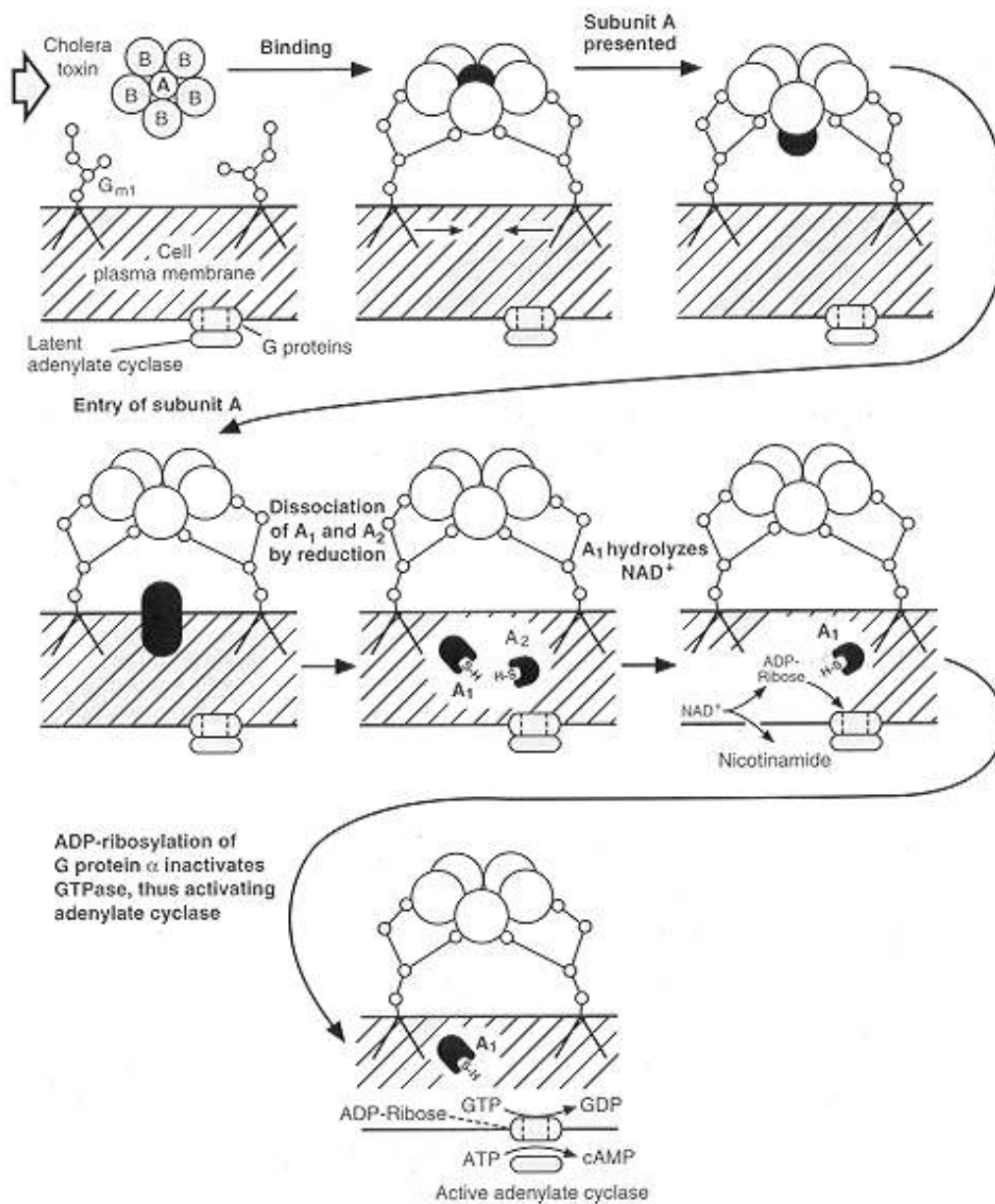


Figure 2 - Mécanisme de la toxine cholérique

al., 1999). Les autres sérotypes, classifiés comme non épidémiques, ou non-O1/O139. Ils n'ont pas la capacité de produire la toxine cholérique, mais toutes les souches sont productrices d'une hémolysine. *V.cholerae* est sensible à l'acidité et meurt généralement au niveau de l'estomac; les personnes ayant une acidité gastrique plus faible sont donc plus sensibles au pathogène (Butt *et al.*, 2004 (1)).

2.4.2 Pathogénicité

2.4.2.1 Toxine cholérique

La toxine cholérique est le facteur de virulence responsable de la diarrhée sévère observée dans la maladie du cholera. La molécule est composée de 2 sous-unités A et B (fig. 1). La sous-unité B résulte de l'assemblage de 5 peptides identiques et permet à la toxine d'adhérer à la membrane par liaison au ganglioside G_{M1} , un récepteur membranaire lipidique. La sous-unité A, association des deux peptides A1 et A2, constitue la partie active de la toxine (Lencer, 2001).

Le gène structural de cette toxine est encodé dans un phage lysogénique (CTx Φ) intégré dans le grand chromosome de la bactérie. *V.cholerae*, une fois dans la lumière intestinale, est capable d'adhérer à la muqueuse intestinale grâce à l'expression d'un pili. Cette adhérence est suivie par la sécrétion de l'entérotoxine cholérique (Lencer, 2001). La liaison de la molécule aux récepteurs G_{M1} à la surface des entérocytes induit son endocytose. Elle traverse alors la cellule, en passant par le Golgi, jusqu'au pôle basal au niveau du réticulum endoplasmique. La sous-unité A1 active est ensuite libérée. Une fois dans le cytosol, celle-ci migre jusqu'à l'adenylate cyclase, à la surface cytoplasmique de la membrane basolatérale (Lencer, 2001). Elle hydrolyse alors le NAD^+ , libérant un ADP-ribose qui va se lier à une protéine G. L'ADP-ribosylation active l'adenylate cyclase, provoquant une augmentation de cAMP (fig. 2). Ce dernier, via l'activation de la protéine kinase A (PKA), conduit à la phosphorylation de canaux ioniques, entraînant une sécrétion massive d'électrolytes et d'eau dans la lumière intestinale (Baron, 1996; Skalhogg *et al.*, 2000).

2.4.2.2 Hémolysine

L'hémolysine est une protéine soluble dans l'eau, dont la forme monomérique présente un poids moléculaire de 65kDa. Son mécanisme d'infection est moins connu que celui de la toxine cholérique, mais on sait depuis peu qu'elle est capable de provoquer la formation de vacuoles dans les cellules "Vero" (fig. 3) (Coelho *et al.*, 2000). Elle est capable de se lier aux vésicules lipidiques, et d'y former des canaux ioniques transmembranaires par pentamérisation. La toxine est ubiquiste, puisqu'elle est exprimée tant par les sérotypes O1 et O139 que les sérotypes non-O1 et non-O139 (Chattopadhyay *et al.*, 2002). Elle est encodée par le gène *hlyA*, dont la séquence est bien conservée parmi les différentes souches. Cependant, une délétion de 11 paires de base a pu être observée pour ce gène chez des souches de la sixième pandémie (Byun *et al.*, 1999).

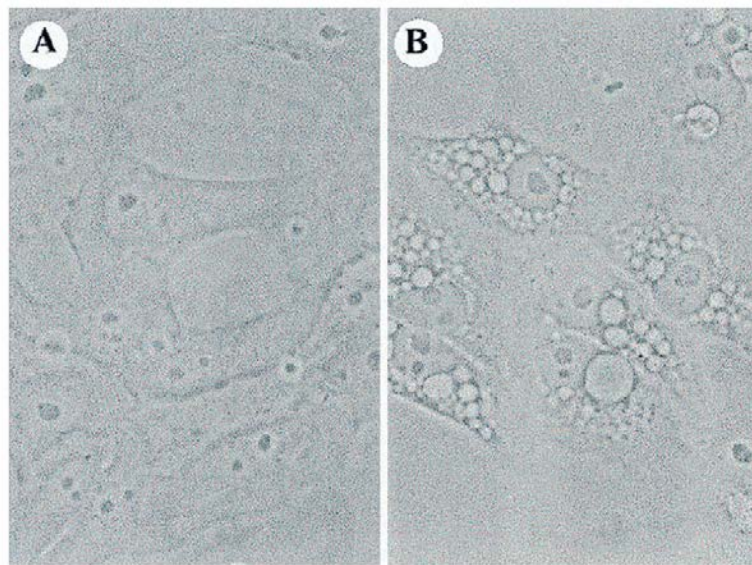


Figure 3 - Photographie en microscopie à contraste de phase : formation de vacuoles induite par l'hémolysine de *V.cholerae*. (A) Cellules "Vero" contrôles (B) Cellules présentant des vacuoles suite au traitement par l'hémolysine. (Coelho et al., 2000)

3. Méthodes de détection et d'identification des *Vibrios*

Si les consommateurs peuvent limiter le risque d'infection par de simples précautions (par exemple bien cuire la nourriture), les industries alimentaires ont comme responsabilité d'assurer des produits sains aux consommateurs. Les efforts pour diminuer le taux d'infection doivent passer par la réduction de la prévalence de la bactérie dans les fruits de mer en plus du développement de méthodes de détection rapides, spécifiques et sensibles. Les méthodes conventionnelles de détection de pathogènes sont basées sur des tests bactériologiques décrits précédemment, tels que les mises en culture ou les tests biochimiques, ainsi que sur la technique d'hybridation sur colonie. Bien qu'efficaces, ces méthodes sont limitées par le temps et le travail conséquent demandés pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (Butt *et al.*, 2004 (1)).

Depuis plusieurs années, des techniques moléculaires de diagnostic ont été développées. Parmi celles-ci, la détection par PCR a été appliquée à bon nombre de pathogènes. On peut citer la détection des gènes *ctxA* et *hlyA* chez *V.cholerae* (Shangkuan *et al.*, 1995; Hoshino *et al.*, 1998; Lipp *et al.*, 2003), la détection des gènes *tl*, *tdh* et *trh* de même que l'ORF8 (Open Reading Frame) chez *V.parahaemolyticus* (Bej *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 2003) ainsi que la détection du gène *vvhA* chez *V.vulnificus* (Parvathi *et al.*, 2005). Cette technique est plus spécifique, plus sensible et demande moins de temps que les méthodes conventionnelles. Néanmoins, la discrimination des souches potentiellement virulentes nécessite le ciblage de plus d'un gène, afin d'éviter les faux négatifs, nécessitant un surplus de travail.

Une variante de la PCR est la technique de PCR en temps réel, appliquée récemment à la détection de *V.vulnificus* sur base de la présence du gène *vvhA* (Panicker *et al.*, 2004; Panicker *et al.*, 2005). Cette même technique a également été appliquée à la caractérisation de souches de *V.cholerae* par amplification des gènes *rtxA*, *epsM*, *mshA* et *tcpA* (Gubala, 2006) ainsi qu'au pathogène *V.parahaemolyticus*, sur base des gènes *tdh* et *tlh* (Davis *et al.*, 2004). Cette méthode offre l'avantage de pouvoir réaliser une semi quantification au niveau de l'échantillon. Cependant, elle reste limitée par la nécessité d'analyser les gènes ciblés un par un, ce qui demande un temps d'analyse considérable.

Il est donc intéressant de pouvoir disposer d'une technique permettant la détection simultanée de plusieurs gènes cibles. C'est ce que permet la technologie des microdamiers à ADN ou biochips. La technique des biochips couplée à une PCR multiplexe a déjà été développée pour la caractérisation des *Vibrios*. Dans cette étude, les auteurs ont mis au point une PCR multiplexe permettant d'amplifier les gènes *vvh* et *viu* pour *V.vulnificus*, les gènes *ompU*, *toxR*, *tcpI* et *hlyA* pour *V.cholerae* et les gènes *tlh*, *tdh* et *trh* ainsi que l'ORF8 pour *V.parahaemolyticus* (Panicker *et al.*, 2004). Les amplicons issus de cette PCR sont ensuite hybridés sur damier. Cette technique permet donc l'identification de gènes impliqués dans la virulence, mais ne dispose pas de sondes permettant l'identification de l'espèce présente. Or, il est possible qu'un des pathogènes soit présent dans l'échantillon sans présenter ces gènes de virulence, ou qu'une souche d'une autre espèce possède une séquence suffisamment proche de la séquence des sondes pour entraîner une hybridation aspécifique.

4. Gyrase

La gyrase, une topoisomérase de type II, est une enzyme clé dans les processus de croissance et de division cellulaire. De par la nature de la double hélice d'ADN, des problèmes topologiques sont inévitables lors de sa réplication et sa transcription. La gyrase est capable d'induire des changements de conformation au niveau de l'ADN afin de résoudre ces problèmes de topologie. En absence d'ATP, l'enzyme peut induire un relâchement de l'ADN, mais en présence d'ATP, elle induit des superenroulements négatifs. Une région d'ADN est ensuite passée au travers d'une autre région via un système de coupure des deux brins, suivit de leur ligation. L'hydrolyse de l'ATP permet de ramener l'enzyme dans son état initial afin de recommencer une nouvelle réaction. La gyrase est donc une enzyme essentielle, que l'on retrouve chez toutes les bactéries (Drlica *et al.*, 1997; Duguet, 1997).

La protéine est un tétramère comprenant deux sous-unités A et deux sous-unités B, encodées par les gènes *gyrA* et *gyrB*. Ces gènes présentent un degré de conservation élevé parmi les bactéries, mais gardent une hétérogénéité suffisante permettant de discriminer les différentes espèces (Huang, 1996; Drlica *et al.*, 1997). C'est pour cette raison que nous avons choisis la gyrase comme gène cible pour la détection des trois *Vibrio* dans ce travail.

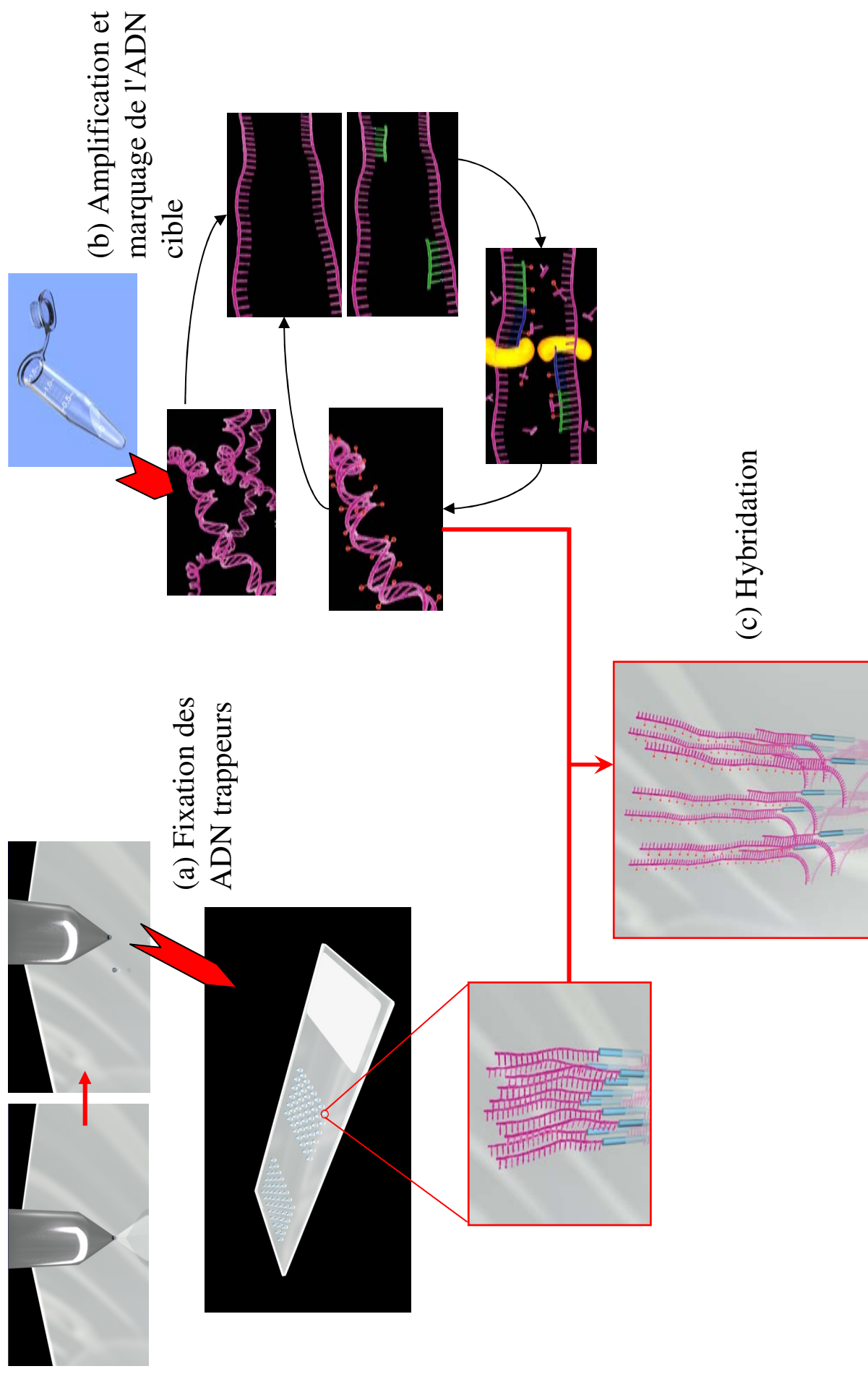


Figure 4 – Principe des puces à ADN.

- (a) Les sondes sélectionnées sont fixées à l'aide d'un robot "spotter" sur une lame de verre
- (b) L'ADN à détecter est amplifié et marqué lors d'une étape de PCR
- (c) Les amplicons marqués sont déposés sur le damier et vont s'hybrider aux sondes complémentaires

5. Les biochips

5.1 Introduction

Les biochips – ou puces à ADN – permettent la détection simultanée de divers fragments de matériel génétique (ADN ou ARN) dans un échantillon biologique (Godefroid, 2000). La technologie des damiers à ADN peut être définie comme une version miniaturisée de la technique du "reverse dot blot". Le "damier" est constitué d'un support solide (le plus souvent une lame de verre) d'environ un centimètre carré sur lequel sont fixées des molécules d'ADN monocaténaïres, appelées sondes. Des extraits d'ADN ou d'ARN, isolés à partir d'échantillons biologiques, sont marqués suite à une réaction enzymatique par incorporation de nucléotides modifiés et hybridés sur le damier. Chaque sonde de capture fixera la séquence cible qui lui est complémentaire – si elle est présente dans l'échantillon – par formation d'hétéroduplexes (fig. 4). Différentes méthodes de détection permettent d'identifier la ou les séquence(s) cible(s) présente(s) dans l'échantillon en analysant l'intensité du signal à chaque position (Zammatteo *et al.*, 2002).

5.2 Principe d'hybridation

5.2.1 Hybridation moléculaire

La réaction centrale qui s'opère dans les puces à ADN repose sur le principe d'appariement entre bases complémentaires - principe mis en évidence par Watson et Crick. Pour rappel, les acides nucléiques sont composés d'une succession de quatre bases nucléotidiques : l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymidine (dans l'ADN) ou l'uracile (dans l'ARN). Ces bases peuvent s'apparier deux par deux, par formation de liaisons hydrogènes entre les nucléotides A-T et C-G pour l'ADN, A-U et C-G pour l'ARN (fig. 5) (Watson *et al.*, 1953).

La réaction d'hybridation se déroule en 2 étapes principales : la nucléation et la propagation. Lors de la nucléation, les ADN simples brins cibles rencontrent les sondes au hasard, auxquelles ils se lient par association de quelques bases complémentaires. Cette étape nécessite un apport d'énergie, généralement sous forme de chaleur. Elle est suivie par l'étape de propagation pendant laquelle les liaisons entre bases se propagent de part et d'autre du point de nucléation. Contrairement à la nucléation, cette étape libère de l'énergie. Si les séquences nucléotidiques correspondent parfaitement, la structure double brin est très stable, tandis que si un ou plusieurs mésappariements apparaissent, la structure est déstabilisée (Wolcott, 1992).

5.2.2 Paramètres influençant le taux d'hybridation

Divers paramètres peuvent être modifiés pour améliorer le taux d'hybridation, parmi lesquels la concentration en sonde et en ADN cible, la composition de séquence des hétéroduplex, la concentration en sels, et la température.

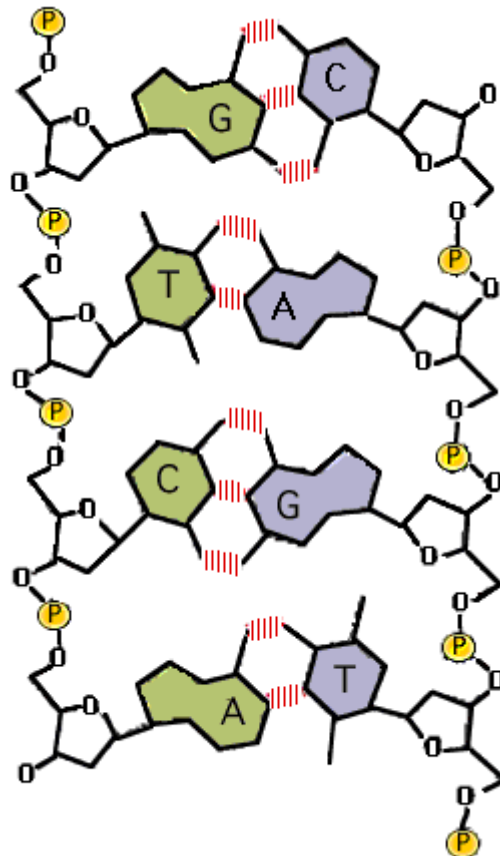


Figure 5 – Principe d'appariement des bases selon Watson & Crick. Les adénines forment des liaisons avec les thymidine, et les cytosines avec les guanines.

Concentration en cibles et trappeurs

Les techniques efficaces de microdéposition et de fixation des sondes autorisent l'utilisation de concentrations élevées pour la conception des damiers à ADN, ce qui permet d'obtenir une réaction cinétique de pseudo premier ordre. De cette façon, le taux d'hybridation est amplement déterminé par la concentration en ADN cible, ce qui limite les effets de faibles variations (Zammatteo *et al.*, 2002). Toutefois, une concentration trop importante en sondes peut diminuer l'efficacité de l'hybridation par interférence stérique entre les sondes, diminuant l'accès à l'ADN cible (Zammatteo *et al.*, 2000).

Température d'hybridation

La température optimale correspond à la vitesse maximale de la réaction d'hybridation. Elle est déterminée à partir de la température de fusion (T_m : "melting temperature") qui se définit comme la température à laquelle 50% de l'ADN est désapparié; celle-ci est fonction de la taille et du pourcentage en G-C de la séquence cible (Zammatteo *et al.*, 2000). Une température élevée favorise le taux d'hybridation car elle apporte l'énergie nécessaire à l'étape de nucléation. De plus, elle minimise la formation d'hétéroduplex non spécifiques. Néanmoins, si elle est trop élevée, elle entrave la formation des ponts hydrogènes entre brins complémentaires et empêche l'hybridation. Généralement, on définit la température d'hybridation à environ 10°C en-dessous de la température de fusion de la sonde d'ADN (Remacle *et al.*, 1994). En pratique, on peut agir sur ce paramètre pour optimiser la spécificité d'hybridation.

Concentration en sels

La présence de sels (le plus souvent NaCl) joue un rôle important pour l'efficacité d'hybridation. En effet, l'ADN porte des groupements phosphates chargés négativement à pH neutre, responsables de répulsions entre les deux brins. Les cations neutralisent ces groupements phosphates, favorisant la formation d'hétéroduplex. Moins il y a de sels, plus le lavage est stringent et élimine les hybridations non spécifiques. Une faible concentration en sels augmente donc la spécificité d'appariement (Zammatteo *et al.*, 2002 (2)).

Composition de la séquence

Pour rappel, les paires de G-C sont liées par trois ponts hydrogène tandis que seulement deux sont formés entre les bases A-T. Les duplex caractérisés par un pourcentage élevé en G-C sont donc plus stables et favorisent les événements de nucléation lors de l'hybridation (Zammatteo *et al.*, 2002 (2)). D'autre part, plus la sonde est riche en G-C, plus sa température de fusion est élevée et plus la température d'hybridation devra être importante.

Taille des trappeurs

La taille des sondes utilisées est variable, allant de produits PCR entiers à de petits oligonucléotides d'une vingtaine de paires de bases. La longueur de la sonde influe sur la spécificité de l'hybridation, ainsi que sur la stabilité de l'hétéroduplex et la vitesse de réaction. Plus la sonde est courte, plus rapide sera la réaction. En contre partie, l'appariement est moins

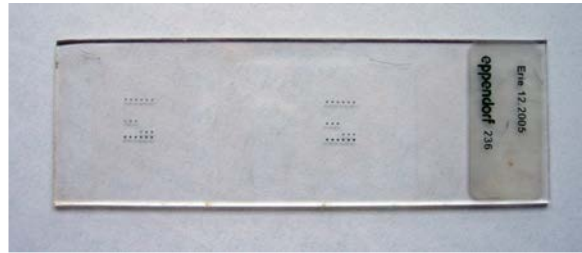


Figure 6 - Exemple de support utilisé pour les damiers à ADN : lame de verre

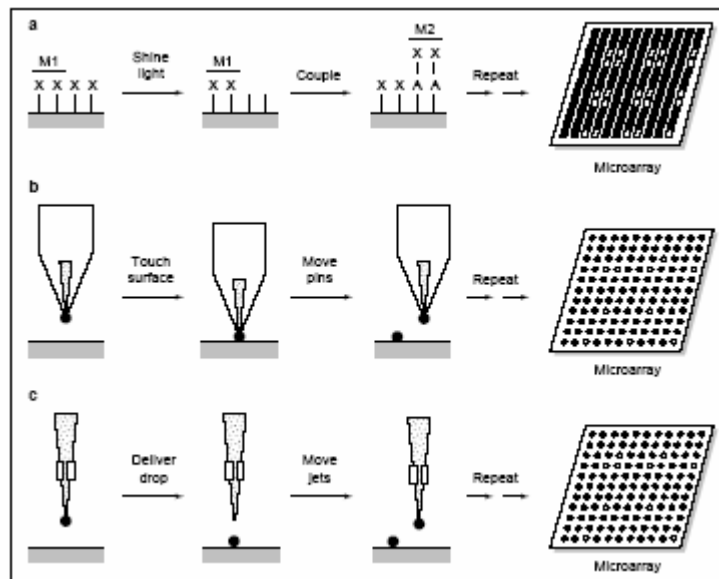


Figure 7 – Différentes méthodes de fixation des ADN trappeurs sur un damier à ADN

- (a) Synthèse in situ par photodéprotection
- (b) Microdéposition mécanique sur le support
- (c) Microdéposition sous forme de jet d'ADN

stable, nécessitant des conditions moins stringentes. Par conséquent, l'hybridation non spécifique est plus importante (Remacle *et al.*, 1994).

5.3 Conception d'un damier à ADN

5.3.1 Choix du support

Depuis l'apparition des premiers damiers, différents types de supports ont été développés. Actuellement, les deux principaux supports utilisés sont les membranes de nylon et les lames de verre.

Les filtres de nylon ou de nitrocellulose, généralement de grande taille (8 x 12cm²), utilisent la radioactivité comme méthode de détection (Godefroid, 2000). Ils sont progressivement remplacés par les lames de verre (fig. 6). En effet, celles-ci présentent plusieurs avantages: elles sont résistantes à haute température, conciliables avec la plupart des processus de production, ainsi qu'avec la détection par fluorescence (Zammatteo *et al.*, 2000; Zammatteo *et al.*, 2002). Par rapport aux supports poreux, les sondes sont rendues plus accessibles à l'hybridation, car le liquide ne pénètre pas la surface de la lame. Par conséquent, la sensibilité de la détection est augmentée. Par ailleurs, les lames de verre présentent un faible bruit de fond. Elles sont compatibles avec les appareils de lecture et rigides, ce qui facilite les manipulations. La détection des hybrides sur ce type de support se fait par fluorescence ou par colorimétrie (Godefroid, 2000; Zammatteo *et al.*, 2002).

Un troisième type de support en cours de développement est le silicium. L'ambition à terme avec ce matériau est d'obtenir un signal électrique à la place du signal lumineux et d'intégrer un microprocesseur qui permette la lecture et l'interprétation des résultats (Godefroid, 2000).

5.3.2 Fixation des ADN trappeurs

Quelque soit le support utilisé, il est traité de façon à former un réseau dense et régulier de surfaces où sont greffées les sondes. Les damiers à ADN peuvent être élaborés soit par dépôt mécanique, soit par synthèse in situ des sondes à la surface du support.

La technique de synthèse in situ (fig. 7a), basée sur la chimie combinatoire, permet la synthèse de milliers de polymères. Dans cette technique, une lame de verre est traitée de manière à présenter des groupements aminés protégés par un groupement photolabile. Grâce à l'utilisation d'un masque photolithographique, des zones définies sont soumises à la lumière, entraînant une photo-déprotection et l'exposition sélective des groupements aminés. Des déoxynucléotides phosphoramidite, qui ont également un groupe protecteur photolabile à l'extrémité 5', peuvent alors réagir avec les groupements aminés là où les sites ont été exposés à la lumière. En répétant ce processus avec des masques différents, il est possible de diriger la synthèse de milliers de sondes déterminées. Cependant, les opérations de déprotection et de couplage ne sont pas toujours parfaites, ce qui peut entraîner la formation de séquences oligonucléotidiques erronées. De ce fait, la taille des segments générés est limitée à environ 30 bases; au-delà, les séquences incomplètes s'accumulent (Lipshutz *et al.*, 1999; Godefroid, 2000; Zammatteo *et al.*, 2002).

La méthode de microdéposition permet de déposer physiquement des microgouttes de sondes présynthétisées par PCR ou synthèse chimique en des points précis et connus de la puce. Les sondes étant synthétisées avant la fixation au support, il n'y a pas de limitation au niveau de la longueur de la séquence. Il est souvent nécessaire d'ajouter un espaceur entre la sonde et le support afin de faciliter la réaction d'hybridation. Le dépôt peut se faire simplement par microdéposition mécanique à l'aide d'un robot (fig. 7b), ou la sonde peut être envoyée sous forme de jet de solution d'ADN vers la puce (fig. 7c). Par cette méthode, il est possible de fabriquer des damiers de n'importe quelle molécule d'intérêt, que ce soit des acides nucléiques, des anticorps, des lipides, etc. De plus, les sondes peuvent être purifiées et leur concentration ajustée avant le spotting (Godefroid, 2000; Zammattéo *et al.*, 2002)

5.3.3 Méthode d'attachement des sondes au support

Une fois le support déterminé, il est primordial que les sondes de capture soient liées de façon stable tout en restant accessibles pour l'hybridation. Pour cela, deux approches peuvent être envisagées : les méthodes de couplage non covalent et les méthodes de couplage covalent.

Plusieurs méthodes de couplage non covalent ont été testées pour fixer l'ADN au support, comme les interactions électrostatiques par la polylysine ou les interactions hydrophobes. L'inconvénient de cette technique est que les sondes d'ADN peuvent se détacher de la surface si la concentration en sels est trop importante ou la température trop élevée. De plus, l'ADN est lié à la surface sur toute sa longueur, ce qui le rend moins accessible et diminue l'efficacité de l'hybridation. On préfère donc les techniques de liaison covalente.

Afin de fixer les sondes de façon covalente, le support peut être traité chimiquement de façon à présenter des fonctions spécifiques, telles que des groupements amines, époxydes, acides carboxyliques ou aldéhydes. La réaction entre les résidus thymidine de l'ADN et les groupements positifs est médiée par une irradiation aux rayons UV. Cependant, cette technique ne permet pas de déterminer la localisation ni le nombre de sites de fixation. Par conséquent, la longueur de la sonde impliquée dans l'hybridation varie au cas par cas. Pour éviter ce problème, une méthode alternative a été mise au point, dans laquelle l'ADN est fixé par une de ses extrémités. Il a été montré que la formation d'un lien covalent imine entre une amine fixée à l'extrémité de l'ADN et un groupement aldéhyde à la surface de la lame est une méthode de choix dans l'élaboration d'un damier à ADN. Le lien imine, instable, est ensuite réduit en lien amine plus stable, en présence d'un agent réducteur (Zammattéo *et al.*, 2000; Zammattéo *et al.*, 2002).

5.4 Techniques de détection

Il s'agit ici de repérer ce qui a été effectivement hybridé, c'est-à-dire de déterminer quelles sont les sondes complémentaires de cibles éventuellement contenues dans l'échantillon. Pour cela, trois méthodes de détection ont été mises au point : la radioactivité, la fluorescence et la coloration à l'argent.

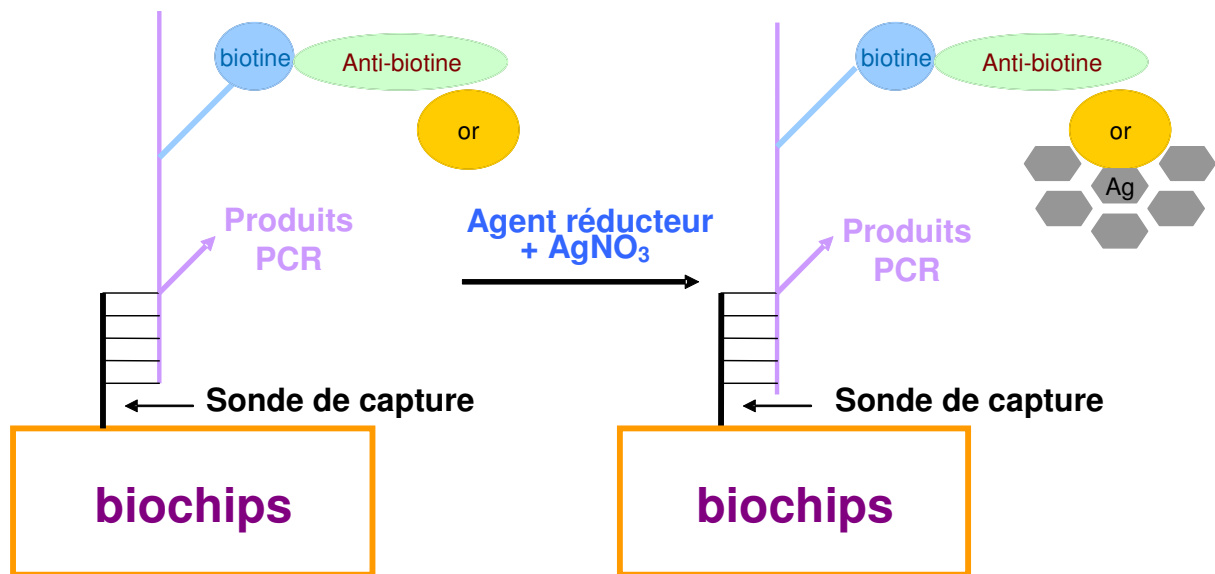


Figure 8 – Principe de la coloration à l'argent. La présence d'une biotine couplée à l'ADN cible permet la liaison d'un anticorps anti-biotine. Cet anticorps est lui-même couplé à une particule d'or présentant une activité autocatalytique de précipitation de l'argent. Les précipités d'argent sont ensuite détectés en colorimétrie.

La radioactivité, utilisée essentiellement pour la révélation sur membrane de nylon, disparaît progressivement, d'une part à cause de sa nocivité et d'autre part suite à l'usage de moins en moins courant des membranes de nylon.

Actuellement, la méthode standard de marquage de l'ADN est l'utilisation de molécules fluorescentes. Le marquage est réalisé au cours de la synthèse de l'ADN cible par incorporation de nucléotides modifiés. On distingue les méthodes de détection directes et indirectes. Les méthodes directes impliquent l'utilisation de nucléotides directement couplés à des molécules fluorescentes. Dans le cas des méthodes de détection indirectes, l'ADN est marqué par une molécule telle que la biotine, reconnue par un anticorps spécifique couplé à un fluorophore. Une variété de fluorophores peut être utilisée, par exemple la cyanine 3 ou la cyanine 5, permettant des analyses simultanées et distinctes de plusieurs échantillons. La lecture des résultats se fait grâce à l'utilisation d'un scanner confocal. Toutefois, le coût de l'équipement nécessaire limite l'utilisation de cette technique au domaine de la recherche (Zammatteo *et al.*, 2002). De plus, les molécules fluorescentes sont sensibles au phénomène de photo-décoloration et nécessitent des précautions particulières d'utilisation (Foultier *et al.*, 2005).

Plusieurs méthodes alternatives de révélation ont été proposées. Par exemple, la détection par chimioluminescence présente une sensibilité similaire à la fluorescence mais elle est limitée par la diffusion de la lumière émise sur un film photographique. Une autre possibilité est la détection par colorimétrie (Alexandre *et al.*, 2001).

Alexandre *et al.* (2001) ont montré que la détection colorimétrique à l'argent présente un certain nombre d'avantages. Le principe en est simple : les molécules d'ADN cible sont marquées par incorporation de nucléotides biotinylés lors de l'amplification. Après hybridation, des anticorps anti-biotine couplés à des particules d'or sont ajoutés et vont se lier à la biotine. Le signal est amplifié lors de l'addition d'une solution d'argent (fig. 8). En effet, sous l'activité catalytique de l'or et en présence d'un agent réducteur, les ions d'argent précipitent en argent métallique au niveau des particules d'or colloïdal (Alexandre *et al.*, 2001). L'amplification obtenue par cette méthode est considérable, au départ d'un diamètre de 20 nm pour la particule d'or, on peut obtenir un cristal d'argent de 1 μm (Foultier *et al.*, 2005).

Cette méthode présente de nombreux avantages. La sensibilité de détection ainsi que la résolution sont comparables à ce qui est obtenu en fluorescence. En effet, la limite de détection, que ce soit en fluorescence ou par précipitation à l'argent, est de 0,1 fmol d'ADN cible biotinylé. De plus, il s'agit d'un procédé autocatalytique de dépôt métallique qui offre une capacité d'amplification supérieure à celle obtenue avec des enzymes. En outre, les dépôts d'argent reflètent la lumière dans le spectre du visible, ce qui permet l'utilisation d'un scanner colorimétrique plus simple et moins cher que le scanner confocal. Ce dépôt est également stable et permet la conservation des damiers à long terme. Enfin, la méthode est applicable tant pour les lames de verre que pour des supports en plastique ou en polycarbonate (Alexandre *et al.*, 2001).

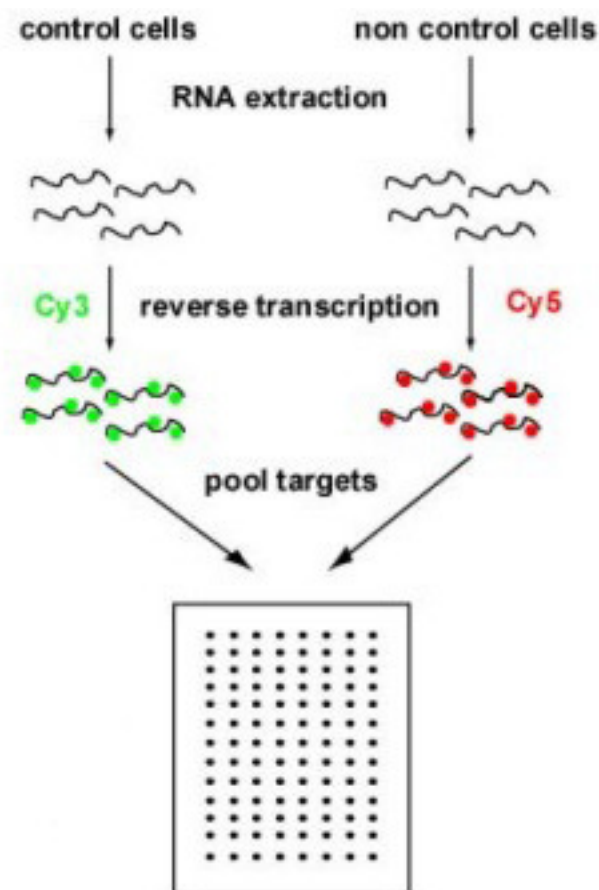


Figure 9 – Application de la technologie des damiers à ADN dans le cadre de l'analyse d'expression de gènes. Suite à une extraction de l'ARN dans une situation contrôle et d'intérêt, celui-ci est marqué par des fluorochromes lors d'une transcription inverse. Les fragments d'ADN marqués ainsi obtenus sont alors hybridés sur le damier et analysés.

5.5 Applications

Sur base de la quantité de sondes différentes disponibles, on distingue les damiers à basse densité, présentant moins de 500 spots/cm², et les damiers à haute densité, avec plus de 500 spots/cm² (Zammatteo *et al.*, 2002). Les damiers à ADN à basse densité sont eux-mêmes classés en deux grandes catégories selon le matériel analysé et le niveau de quantification recherché.

5.5.1 Damiers à expression de gènes

Les damiers à expression de gènes permettent une analyse semi-quantitative de l'ARN messager. Après extraction, l'ARN est rétro-transcrit en ADNc, étape au cours de laquelle l'ADN est marqué. Il est ensuite hybridé sur un damier à ADN qui sera analysé en fluorescence (fig. 9). Cette démarche permet de quantifier l'expression de nombreux gènes en parallèle ou de comparer le profil d'expression génique d'un type cellulaire dans deux conditions données. Par exemple, il est possible de comparer le profil d'expression d'une lignée cellulaire par rapport au même type cellulaire mais cancéreux. Grâce à l'utilisation de marqueurs différents, il est possible d'hybrider deux populations d'ADN marqué sur un seul damier (Zammatteo *et al.*, 2002 (2)).

5.5.2 Damiers "génomiques"

La puce "génomique" permet quant à elle une analyse qualitative de l'ADN contenu dans un échantillon. Ce damier est utilisé par exemple pour détecter et identifier un organisme sur base d'une séquence nucléique particulière. La quantité de matériel génétique étant limitée dans les échantillons, une étape d'amplification est nécessaire avant l'hybridation sur damier. La variabilité d'efficacité lors de l'amplification empêche une quantification précise (Zammatteo *et al.*, 2002).

Parmi toutes les applications imputées aux biochips, la plus importante est sans doute le diagnostic moléculaire, c'est-à-dire la détection de maladies génétiques et infectieuses. Les damiers à ADN permettent notamment de mettre en évidence des mutations génétiques - par exemple un polymorphisme (Iwasaki *et al.*, 2002) - à forte probabilité d'être associées à telle ou telle maladie. Un exemple bien connu est l'identification d'insertions, de délétions ou de mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2, connues pour augmenter le risque de cancer du sein (Favis *et al.*, 2000; Favis *et al.*, 2000 (2)). Toujours dans le cadre du cancer du sein, Wen *et al.* (2000) ont mis au point un damier permettant d'analyser des mutations dans le gène P53 (Wen *et al.*, 2000). Une autre application est la détection de mutations dans le gène codant le régulateur de conductance transmembranaire impliqué dans la maladie de la fibrose kystique (Cronin *et al.*, 1996). Il existe également une puce permettant l'identification de gènes MAGE-A codant des antigènes spécifiques de tumeurs (Zammatteo *et al.*, 2002 (2)).

D'autre part, les biochips peuvent être exploitées afin de détecter et d'identifier des espèces de virus et bactéries, leurs facteurs de virulence ou leurs résistances aux antibiotiques. Cette technologie permet d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement que les techniques microbiologiques traditionnelles, en particulier pour la détection d'organismes non viables ou non cultivables. La rapidité du test est un avantage majeur puisqu'il permet de choisir une

antibiothérapie adaptée le plus tôt possible et donc plus efficace. De plus, cela pourrait permettre de mieux cibler l'infection, ce qui réduirait l'usage abusif des antibiotiques, diminuant ainsi le risque d'apparition de résistances (Zammatteo *et al.*, 2002). Dans ce contexte, la technique des puces à ADN a pu être appliquée pour détecter les *Staphylocoques* et leur résistance à la méthicilline, par l'utilisation des séquences *femA* et *mecA* (Hamels *et al.*, 2001). Par ailleurs, la société Affymetrix a mis au point une puce permettant de détecter simultanément différentes espèces de Mycobactéries et leur résistance à la Rifampicine (Zammatteo *et al.*, 2002).

C'est dans ce dernier volet d'application que se situe le travail réalisé au cours de ce mémoire. En effet, nous cherchons ici à développer un damier à ADN permettant d'une part la détection et l'identification des trois espèces de *Vibrio*, à savoir *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* et *V.vulnificus*, et d'autre part la mise en évidence du caractère pathogène de ces bactéries.

Objectif

Comme cela a déjà été dit, les *Vibrio*, et en particulier *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* et *V.vulnificus*, peuvent être présents dans les produits alimentaires issus de la mer et provoquer, s'ils sont ingérés, une pathologie plus ou moins grave selon le pathogène et le contexte. Il est donc intéressant de développer un outil permettant la détection de ces trois pathogènes dans des échantillons alimentaires afin d'éviter de telles infections. C'est ce que permet la technique des biochips, par la détection de gènes connus et spécifiques des bactéries d'intérêt dans un échantillon donné. L'objet de ce mémoire est donc la mise au point de cette technologie dans le cadre de la détection et de l'identification simultanées de trois espèces de *Vibrio* les plus fréquemment rencontrés dans ce genre de pathologie (*V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* et *V.vulnificus*) ainsi que de leur caractère pathogène. Par la suite, le damier sera complété pour la détection d'autres pathogènes

En pratique, le développement du damier se déroule en 4 étapes :

- I. La première étape consiste à déterminer quels sont les gènes cibles les plus appropriés au développement de la biochip.
- II. La deuxième étape, nécessaire afin de disposer de suffisamment de matériel génétique pour la détection, est consacrée à la mise au point des conditions d'amplification spécifique des différents marqueurs. En pratique, deux PCR seront mises au point, une PCR consensus amplifiant un marqueur commun permettant d'identifier spécifiquement les espèces ciblées, et une PCR multiplexe, dite de "virulence", autorisant la détection de certains marqueurs de virulence propres aux espèces d'intérêts.
- III. Une fois les PCR mises au point, les amplicons obtenus sont ensuite séquencés afin de sélectionner les sondes en vue de la détection spécifique des différents marqueurs.
- IV. La dernière étape consiste à tester l'efficacité de détection des ADN cibles par hybridation. La spécificité des sondes est contrôlée lors de l'hybridation des espèces d'intérêt mais également d'espèces proches ou susceptibles d'être présentes dans les échantillons alimentaires. Les résultats seront visualisés par la méthode de précipitation à l'argent. Une mise au point des conditions d'hybridation sera sans doute nécessaire afin d'optimiser les réponses obtenues. Les tests de sensibilité permettront également de fixer la limite minimale de concentration dans l'échantillon permettant la détection.

Matériel et méthodes

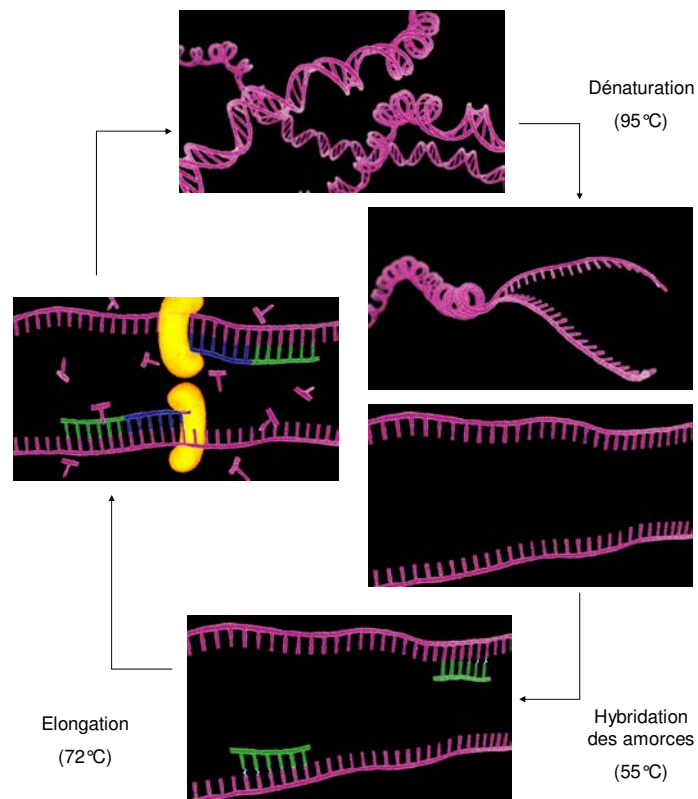


Figure 1 - Schéma des principales étapes de la PCR.

Une étape à 95°C permet la dénaturation de l'ADN cible. Elle est suivie d'une étape à 55°C, permettant l'hybridation des amorces aux séquences complémentaires. Enfin, l'extension des amorces par la polymérase s'accomplit lors de la transition à 72°C.

(Illustration : DESMET S.)

1. Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

1.1 Principe

Les analyses de matériel génétique requièrent souvent qu'une quantité suffisante d'ADN soit disponible. La PCR (Polymerase Chain Reaction), décrite en 1985 par Kary B. Mullis, est une réaction enzymatique qui permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN d'intérêt. Cette technique se base sur les propriétés d'enzymes thermostables appelées "polymérase", dont le rôle est de copier le matériel génétique. A partir d'une molécule matricielle (ADN ou ARN), et grâce à l'utilisation d'oligonucléotides (les amorces), la polymérase est capable de synthétiser le brin complémentaire en présence de déoxynucléotides. Les amorces sont de courtes séquences nucléotidiques complémentaires de régions connues de l'ADN, situées de part et d'autre du fragment d'intérêt. Elles s'hybrident à l'ADN cible devenu simple brin après une étape de dénaturation.

En pratique, la PCR est la répétition de cycles de 3 étapes (figure 1) : dans un premier temps, les 2 brins de l'ADN cible doivent être séparés en chauffant à une température d'environ 95°C, c'est l'étape de dénaturation. Vient ensuite la deuxième étape, qui est l'hybridation des amorces aux séquences complémentaires. La dernière étape est l'extension des amorces par la polymérase, qui synthétise le brin complémentaire à l'ADN cible. Chaque étape est caractérisée par une température optimale liée à la fonction en cours. La température d'hybridation des amorces, par exemple, est généralement déterminée par la température de fusion ($T_m = 4 \times G-C + 2 \times A-T$) et se situe entre 5°C et 10°C en-dessous de cette température. La température d'élongation, quant à elle, avoisine les 72°C.

Afin d'éviter d'éventuelles contaminations, deux précautions particulières sont prises lors de la manipulation. Tout d'abord, la préparation des échantillons PCR est réalisée dans deux pièces distinctes. Le mélange comprenant tous les composés nécessaires à la réaction, à l'exception de l'ADN génomique, est préparé dans la pièce "PCR1". L'ADN cible est ensuite ajouté dans le mélange réactionnel en pièce "PCR2". D'autre part, l'uracyl-DNA-glycosylase est utilisée afin de réduire le risque de contamination par de l'ADN exogène. Cet enzyme hydrolyse les liens désoxyuridiques détruisant ainsi d'éventuels amplicons contaminants. C'est pourquoi on utilisera des dUTP, et non des dTTP, lors de la PCR. L'utilisation de cet enzyme requiert une étape préliminaire d'hydrolyse de 10 minutes à 20°C avant d'entamer les cycles de PCR.

Dans le cadre de ce mémoire, deux types de PCR ont été réalisées. La première, dite "non biotinylée", a permis de déterminer les paramètres optimaux d'amplification et de séquencer les gènes d'intérêt pour la mise en place d'une banque de données. La deuxième est la PCR biotinylée, dont les produits ont été hybridés sur damiers. L'étape de révélation après hybridation est basée sur l'incorporation de ces biotines.

1.2 Matériel

- Eau stérile
- Nucléotides dATP, dCTP, dGTP et dUTP 100mM (Roche, Allemagne)
- dATP biotinylés 1mM (Roche, Allemagne)
- dCTP biotinylés 1mM (Roche, Allemagne)
- Tampon "Biotools 10x Buffer" (Biotools B&M Labs, Espagne)
- $MgCl_2$ 50 mM (Biotools B&M Labs, Espagne)

- ULTRATOOLS Polymérase 1U/μl (Biotools B&M Labs, Espagne)
- Uracil-DNA-Glycosylase heat labile 1U/μl (Roche, Allemagne)
- Amorce 200 μM (Eurogentec, Belgique)
- PCR reaction tube (Eppendorf, Allemagne)
- Appareil PCR : MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler (Biozym, Hollande)
- Hotte captair bio (Erlab, France)
- ADN génomique des différentes espèces étudiées, fournis par le laboratoire de Microbiologie des denrées alimentaires (Ulg)

1.3 Méthode

En pièce PCR1, préparation de la solution PCR :

Cette solution contient les différents composants nécessaires à la réaction de polymérisation, à l'exception de l'ADN génomique. Le volume final est fonction de la quantité de tubes PCR, en considérant un volume de 27 μl par tube. La polymérase est ajoutée en dernier afin d'éviter une activité précoce de l'ADN polymérase, ce qui entraînerait une perte de spécificité. Toujours pour la même raison, dès que la solution est préparée, les tubes PCR sont conservés sur glace entre chaque manipulation.

1. PCR non biotinylée (pour séquençage) :

- 200μM de dATP, dCTP, dGTP
- 400μM de dUTP
- Tampon 0,3x
- 4 mM de MgCl₂
- 1U d'Ultratools
- 0,1μM d'amorces
- Le volume est complété avec de l'eau stérile

2. PCR biotinylée (pour hybridation) :

- 150μM de dATP, dCTP
- 200μM de dGTP
- 400μM de dUTP
- Tampon 0,3x
- 4mM de MgCl₂
- 1U d'Ultratools
- 1U d'Uracil DNA Glycosylase
- 10μM de dATP et dCTP biotinylés
- 0,1μM d'amorces
- Le volume est complété avec de l'eau stérile

En pièce PCR2, ajout de l'ADN génomique

L'ADN génomique est ajouté au mélange à raison de 15 ng par tube (soit 3μl d'ADN par tube).

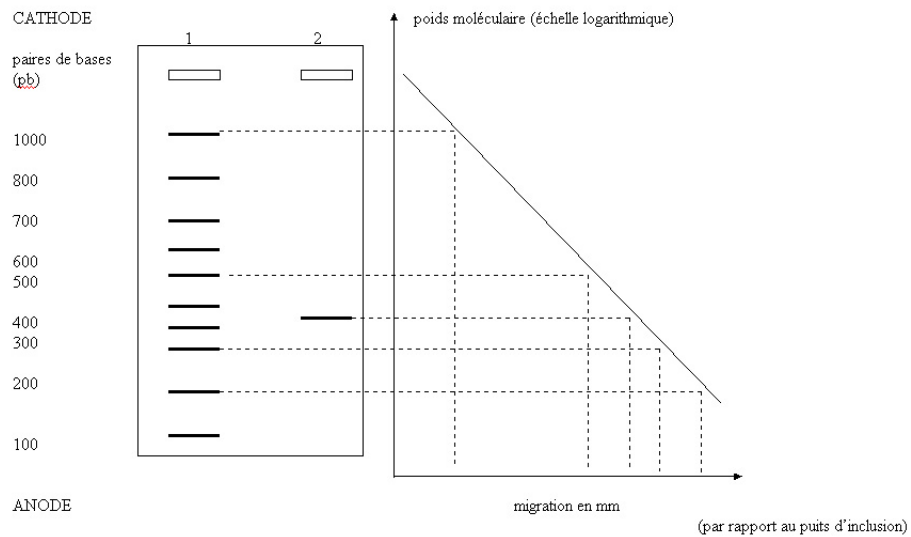


Figure 2 - Electrophorèse en gel d'agarose.

En 1, un marqueur de poids moléculaire. En 2, un échantillon dont la taille est à déterminer. A droite, une courbe d'étalonnage permettant de déterminer la taille des fragments en fonction de la distance de migration.

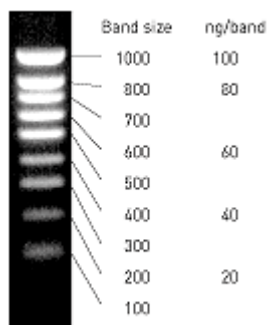


Figure 3 - Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder permettant une estimation de la quantité d'ADN engagé

Programme PCR

Les tubes sont déposés dans un appareil PCR. Les programmes utilisés sont les suivants:

1. PCR non biotinylée :
 - 5 minutes à 95°C
 - 35 cycles : 30 secondes à 94°C
30 secondes à 55°C
45 secondes à 72°C
 - 10 minutes à 72°C
 - Temps indéterminé à 4°C pour stopper la réaction
2. PCR biotinylée (pour hybridation) :
 - 10 minutes à 22°C
 - 5 minutes à 95°C
 - 35 cycles : 30 secondes à 94°C
30 secondes à 55°C
45 secondes à 72°C
 - 10 minutes à 72°C
 - Temps indéterminé à 4°C pour stopper la réaction

Lorsque la PCR est terminée, les échantillons sont stockés à -20°C.

2. Electrophorèse sur gel d'agarose

2.1 Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le phénomène de migration est basé sur la charge négative de l'ADN en milieu basique. Soumis à un champ électrique, les fragments d'ADN se déplacent vers l'anode à une vitesse qui est fonction du poids moléculaire et donc de la taille des fragments. Plus les fragments sont petits, plus ils se fauillent facilement entre les "mailles" du gel et plus ils migrent loin (figure 2). La vitesse de migration est également fonction du pourcentage en agarose : si le pourcentage est élevé, le gel est plus dense, les "mailles" plus serrées, ce qui ralentit la progression des fragments d'ADN.

La taille des fragments est déterminée précisément en faisant migrer en parallèle aux échantillons un marqueur de poids moléculaire (figure 3). Il est également possible d'estimer la concentration d'ADN en utilisant un marqueur particulier, le Smart Ladder. La révélation des bandes d'ADN se fait grâce à la présence dans le gel de bromure d'éthidium, un agent s'intercalant dans l'ADN double brin et qui fluoresce lorsqu'on l'expose aux UV.

2.2 Matériel

- Agarose electrophoresis grade (Invitrogen, UK)
- Tampon TBE 1x, réalisé à partir de tampon TBE 10x (1M de Tris HCl, 0,9M d'acide borique, 10 mM d'EDTA 0,5M pH8)
- Bromure d'éthidium 500 µg/ml (Sigma, Allemagne)



Figure 4 - Cuve d'électrophorèse Horizon 11.14

- Blue/Orange Loading Dye 6x (Promega, USA)
- Marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec, Belgique)
- Marqueur de poids moléculaire 100pb DNA ladder (Promega, USA)
- Cuve d'électrophorèse Horizon 11.14 (Gibco Brl, USA) (figure 4)
- Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)
- Lampe UV (Vilber-Lourmat, France)
- Appareil photo Kaiser RA1 + Photo-print IP-001-SD (Vilbert-Lourmat, France)
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + Imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)

2.3 Méthode

Préparation du gel d'électrophorèse

Deux porosités de gel ont été utilisées : 1% et 2% d'agarose.

- Pour réaliser un gel 1%, peser 1g d'agarose .
- Pour un gel 2%, peser 2g d'agarose.
- Ajouter 100 ml de tampon TBE 1x.
- Dissoudre l'agarose en portant à ébullition au micro-onde.
- Laisser refroidir sans laisser polymériser et ajouter 20 µl de bromure d'éthidium.
- Verser le gel sur le support adapté à la cuve d'électrophorèse, munie de peignes pour former les puits dans lesquels seront déposés les échantillons.
- Laisser polymériser le gel pendant 20 à 30 minutes.

Préparation des échantillons

- Dans un microtube, pipeter 3µl d'échantillon d'ADN.
- Ajouter 2µl de bleu de chargement (Load dye) et 5µl d'eau.
- Prévoir un microtube contenant 5 µl de marqueur moléculaire (Ladder 100pb ou Smart Ladder).

Chargement des échantillons sur le gel

- Placer le support du gel dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE 1x et retirer doucement les peignes.
- Déposer les échantillons alourdis au bleu de chargement ainsi que l'étalon de poids moléculaire dans les puits.
- Fermer la cuve d'électrophorèse, brancher les bornes au générateur et régler celui-ci sur 120 mV.
- Arrêter le générateur lorsque le front de migration du bleu de chargement atteint le bas du gel.
- Les résultats sont ensuite visualisés sous rayons ultraviolets.

3. Purification des produits PCR après migration sur gel d'agarose 1%

3.1 Principe

Une fois la migration des produits de PCR terminée, il est possible de les récupérer si des analyses supplémentaires sont nécessaires. Pour cela, le gel est découpé à l'emplacement de la bande d'intérêt et dissout à haute température. La solution obtenue est passée sur une membrane de silice qui absorbe l'ADN en condition de haute salinité; les impuretés sont

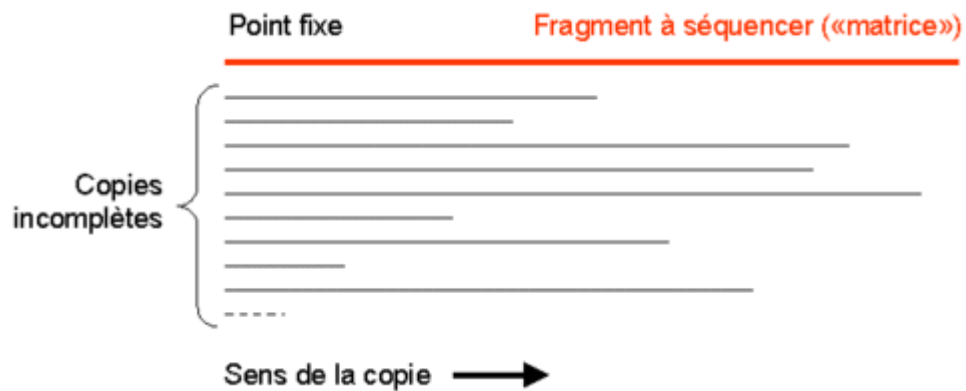


Figure 5 - Principe de la PCR de séquençage : l'introduction aléatoire de didéoxynucléotides génère des copies du fragment à séquencer incomplètes et de taille variable.

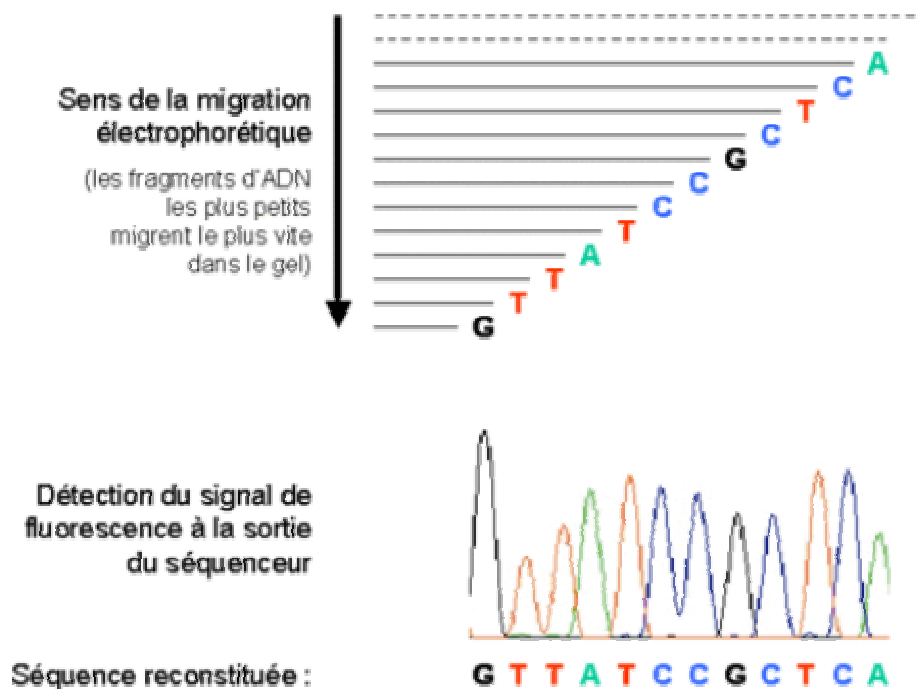


Figure 6 - Principe du séquençage.

Les fragments de différente taille sont séparés par migration électrophorétique. Les nucléotides terminaux sont ensuite analysés pour chaque longueur de fragment.

éliminées lors des lavages de la colonne. L'ADN lié à la membrane est finalement élué à l'aide d'eau stérile.

3.2 Matériel

- Kit : Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)
- Microtube de 1,5ml (Eppendorf, Allemagne)
- Balance (Analis, Belgique)
- Centrifugeuse (Biofuge Pico, Allemagne)
- Gel d'agarose 1% contenant les amplicons à purifier

3.3 Méthode

- Après migration sur gel d'agarose 1% et révélation, prélever les bandes d'ADN d'intérêt grâce à une lame de scalpel. Déposer celles-ci dans des microtubes préalablement pesés.
- Peser les microtubes contenant les bandes de gel pour en déterminer la quantité découpée.
- Ajouter la solution favorisant la liaison de l'ADN à la membrane selon un rapport de 10µl par 10mg de gel.
- Vortexer et incubé à 65°C jusqu'à dissolution complète du gel.
- Placer une mini colonne dans un tube collecteur pour chaque microtube de gel dissous et transférer le produit de dissolution sur la colonne. Laisser incubé 1 minute.
- Centrifuger pendant 1 minute à 13000 rpm.
- Vider les tubes collecteurs et les replacer sous les mini colonnes.
- Ajouter 700µl de solution de lavage.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm, vider les tubes collecteurs et ajouter 500µl de solution de lavage.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 13000 rpm.
- Placer les mini colonnes dans de nouveaux microtubes. Centrifuger pendant 1 minute pour éliminer l'éthanol résiduel.
- Remplacer les microtubes et ajouter 50µl d'eau stérile dans les mini colonnes.
- Laisser incubé pendant une minute et centrifuger une minute à 13000 rpm.
- Conserver les microtubes à -20°C.

4. Séquençage

4.1 Principe

Le séquençage est réalisé grâce à l'addition de didéoxynucléotides dépourvus de groupement hydroxyle en 3', empêchant la liaison du déoxynucléotide suivant. Ceux-ci s'insèrent au hasard dans de la séquence, générant des fragments de taille différente (figure 5). Ils sont couplés à une molécule fluorescente spécifique de la base remplacée qui permet leur identification après une excitation au laser. Suite à une séparation électrophorétique, les nucléotides terminaux sont déterminés pour chaque longueur de fragment, permettant la reconstitution de la séquence complète (voir figure 6).

4.2 Matériel

- Tubes contenant l'ADN à séquencer
- Eau

- Amorces sens et anti-sens (10 μ M) (Eurogentec, Belgique)
- Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit with amplitaq DNA polymerase (Applied biosystem, USA)
- Appareil PCR : MJ Research PCT-100 peltier Thermal Cyclers (Biozym, Hollande)
- 3700 DNA Analyzer (Applied biosystem, USA)
- Gel acrylamide 4%

4.3 Méthode

- La quantité d'ADN engagée est fonction de la taille du fragment à séquencer :

Taille du fragment	Quantité d'ADN
100 – 200 pb	1 – 3 ng
200 – 500 pb	3 – 10 ng
500 – 1000 pb	5 – 20 ng
1000 – 2000 pb	10 – 40 ng
> 2000 pb	40 – 100 ng

- Ajouter 1 μ l d'amorce sens ou antisens 10 μ M.
- Ajuster le volume à 12 μ l avec de l'eau distillée.

Au laboratoire de séquençage, 2 μ l de kit de réaction et 6 μ l de tampon de séquençage sont ajoutés à ce mélange avant de lancer la PCR de séquençage. Le programme PCR utilisé est le suivant :

- Augmentation rapide de la température jusqu'à 96°C
- 25 cycles : 30 secondes à 96°C
15 secondes à 50°C
4 minutes à 60°C
- Temps indéterminé à 4°C pour stopper la réaction

Une fois la PCR terminée, les échantillons sont précipités grâce à une solution d'éthanol 100% et d'acétate de sodium. Ils sont ensuite dénaturés dans un mélange de formamide et de Bleu/Dextran – EDTA. Les produits d'amplification sont finalement séparés sur gel d'acrylamide 4% et les résultats sont visualisés grâce à l'appareil ABI.PRISM.

5. Fixation des ADN trappeurs sur lames fonctionnalisées

5.1 Principe

Il s'agit de lier de manière covalente les sondes à un support solide, dans ce cas une lame de verre. La lame a été préalablement traitée ("fonctionnalisée") de façon à permettre la liaison entre une fonction amine située à l'extrémité 5' de la sonde et une fonction carbonyle de l'aldéhyde présent sur le support. Le dépôt des microgouttes de sondes se fait grâce à un robot équipé d'une aiguille adaptée.

5.2 Matériel

- Robot "spotteur" (Wow company, Belgique)
- Aiguille de 250 μ m de diamètre (Genetix, Angleterre)
- Lames de verre Diaglass (EAT, Belgique)

- ADN trappeurs (Eurogentec, Belgique)
- Contrôle de fixation : 400 mM
- Contrôle positif d'hybridation (Eurogentec, Belgique)
- Contrôle négatif d'hybridation (Eurogentec, Belgique)
- Eau distillée
- SDS 10%
- NaBH₄ (sodium borohydride) (Aldrich chemical, USA)
- PBS 1X frais
- Ethanol 95% (Merck)
- Portoir métallique pour lame de microscope (Merck, Allemagne)
- Microplaque 384 puits (Nunc International, USA)
- Solution de spotting 1 du kit Diaglass (EAT, Belgique)
- Solution de spotting 2 du kit Diaglass (EAT, Belgique)

5.3 Méthode

La fixation des ADN trappeurs se déroule en trois étapes : il faut tout d'abord préparer les solutions à "spotter", ensuite fixer les sondes, et finalement laver les lames.

Préparation de la plaque

Les solutions de spotting sont réalisées suivant le protocole décrit dans le kit Diaglass (EAT, Belgique). Les solutions d'ADN trappeurs, les contrôles positif et négatif d'hybridation, sont dilués avec cette solution pour obtenir une concentration finale de 3µM. De même, le contrôle de détection est dilué pour obtenir une concentration de 40 nM. Les échantillons sont ensuite transférés dans une plaque 384 puits.

Fixation des sondes

La fixation des sondes sur les lames se fait en chambre blanche, c'est-à-dire dans une pièce stérile, afin d'éviter une contamination extérieure. Elle se fait à l'aide d'un robot particulier (spotter EAT) qui dépose des microgouttes de solution d'ADN à un emplacement précis sur la lame, selon un programme encodé dans un logiciel lié au robot. La fixation terminée, les lames sont incubées une heure à température ambiante.

Afin de vérifier le spotting, les lames sont passées au scanner à fluorescence (laser 663 nm), permettant la détection de sels résiduels localisés au niveau des spots.

Lavage des lames

Afin de stabiliser les liaisons entre les sondes et le support, une succession de lavages est réalisée dans différents tampons. Cette étape permet également d'éliminer d'éventuelles liaisons non covalentes. Au final, les lames sont rincées à l'eau distillée, séchées par centrifugation et stockées à 4°C.

6. Hybridation des produits PCR biotinylés sur biochips et révélation par une coloration à l'argent

6.1 Principe

Les principes d'hybridation et de coloration à l'argent ont été décrits au point 4 de l'introduction.

6.2 Matériel

- Produits PCR biotinylés
- Lames de verre spottées
- Chambres d'hybridation 65µl (Microarray Gene Frame, Abgene, UK)
- Couvres-chambre Coverslips (Abgene, UK)
- Four d'hybridation : hybridiser HB-1D (Techne Duxford, Royaume-Uni)
- Boîtes de Petri
- Eau distillée
- Contrôle positif d'hybridation (Eurogentec, Belgique)
- Denhardt 100x (Eppendorf, Allemagne)
- NaOH 1N
- Genomic HybriBuffer (Eppendorf, Allemagne)
- Solution de lavage Unibuffer, B1 4X pH 7,4 (EAT, Belgique)
- Solution de rinçage Silverquant Buffer 1X (EAT, Belgique)
- Tween 20 100% (Sigma, USA)
- Agent bloquant (Skim milk, Difco, USA)
- Conjugué antibiotine-or (Biocell, UK)
- Solution Silverquant A du kit de révélation (EAT, Belgique)
- Solution Silverquant B du kit de révélation (EAT, Belgique)
- Centrifugeuse de table minispin (Eppendorf, Allemagne)
- Porte lames (Staining Box, EAT, Belgique)
- Scanner colorimétrique Silverquant 6000 (Eppendorf, Allemagne)
- Centrifugeuse centra CL3R (Thermo IEC, USA)

6.3 Méthode

Hybridation des produits PCR

Afin d'éviter une contamination, la solution d'hybridation est préparée sous hotte :

- 5 µl de contrôle positif 50 nM.
- 3,5 µl de solution Denhardt 100X.
- 5 µl de produit PCR.
- Compléter le volume avec de l'eau distillée pour un volume total de 31,5µl.
- Ajouter 3,5 µl de NaOH 0,5N pour dénaturer la solution. Vortexer et centrifuger brièvement. Laisser incubé 5 minutes.
- Ajouter 35 µl de Genomic HybriBuffer pour neutraliser la réaction. Centrifuger brièvement.
- Déposer la solution au milieu de la chambre d'hybridation préalablement collée sur la lame, en faisant attention de ne pas toucher la lame avec le tip.
- Couvrir d'une lamelle couvre-chambre en veillant à ce que la solution se répartisse sur toute la surface délimitée par la chambre.

Tampon de lavage 1 (WB1)	
Unibuffer B1 4x	6,25 ml
Tween 20 100%	0,25 ml
H2O	243,5 ml
Volume final	250 ml
Tampon de lavage 2 (WB2)	
Unibuffer B1 4x	0,5 ml
H2O	99,5 ml
Volume final	100 ml
Tampon de rinçage	
Silverquant buffer 1x	5 ml
H2O	45 ml
Volume final	50 ml
Tampon pré-bloquant	
Unibuffer B1 4x	10 ml
H2O	30 ml
Agent bloquant	400 mg
Tampon de conjugué	
Unibuffer B1 4x	10 ml
H2O	30 ml
Agent bloquant	40 mg
+ conjugué or (dilution 500x)	80 µl

(en dernière minute)

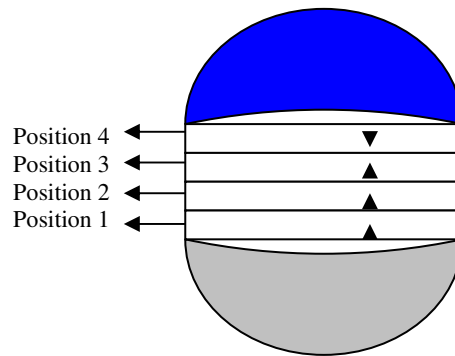
Table 1 - Préparation des différentes solutions de lavage utilisées lors de l'hybridation.

- Incuber les lames pendant 1 heure à 65°C.

Lavage des lames

Les solutions décrites dans la table 1 sont utilisées pour laver les lames après hybridation. Les quantités décrites sont valables pour 2 boîtes porte-lames contenant chacune 4 lames.

Après l'incubation, les chambres sont ôtées et les lames déposées dans une boîte porte-lames contenant le tampon de lavage 1 (WB1), selon le schéma suivant.



- Laver 3 fois les lames, pendant 1 minute, avec le tampon de lavage 1.
- Laver 2 fois les lames, pendant 1 minute, avec le tampon de lavage 2.
- Incuber pendant 10 min à température ambiante en présence de tampon pré-bloquant.

Coloration à l'argent

- Incuber les lames durant 45 minutes dans le tampon de conjugué comprenant l'anticorps anti-biotine couplé à une molécule d'or.
- Laver 4 fois les lames, 1 minute, avec le tampon de lavage 1.
- Laver 1 fois, 1 minute, avec le tampon de rinçage.
- Verser un volume (8,5 ml pour une lame, 7,5 ml pour 2 lames, 6,5 ml pour 3 lames, 5,5 ml pour 4 lames) de solution Silverquant B, suivit d'un volume de solution Silverquant A.
- Incuber les lames pendant 5 minutes en mélangeant doucement.
- Laver les lames 2 fois à l'eau distillée, pendant 30 secondes.
- Sortir les lames et en essuyer le dos pour éviter une précipitation d'argent non spécifique.
- Sécher les lames en les centrifugeant pendant 5 minutes à 600 rpm.

Numérisation et quantification des résultats

Cette étape est réalisée grâce à l'utilisation du scanner Silverquant 6000 et des logiciels Silverquant Scan et Silverquant Analysis. Les damiers sont tout d'abord scannés, numérisés et enregistrés. Les images obtenues peuvent être utilisées dans le programme Silverquant Analysis Software pour la quantification. Pour chaque spot, le programme fournit une valeur correspondant à la médiane de l'intensité de l'ensemble des pixels constituant le spot. Le bruit de fond est également mesuré et sa valeur pourra en être soustraite.

Résultats et discussion

Pour rappel, l'objectif de ce mémoire est la mise au point d'une puce à ADN permettant la détection et l'identification simultanées de l'espèce et du caractère pathogène de trois *Vibrio* dans des échantillons alimentaires.

1. Mise au point des paramètres de la PCR d'identification des espèces et de la PCR de virulence.

1.1 Choix des gènes cibles

1.1.1 Gène cible d'identification de l'espèce.

Il est intéressant de pouvoir détecter et identifier différentes espèces d'intérêt avec un même gène cible amplifié lors d'une seule PCR, quelque soit l'espèce présente dans l'échantillon. Le choix du gène à détecter repose sur trois critères : il doit être présent chez toutes les espèces et comprendre des zones conservées pour la sélection des amorces, mais cependant garder une certaine hétérogénéité entre ces zones conservées afin de déterminer des sondes spécifiques.

Dans le cadre de ce mémoire, notre choix s'est porté sur le gène *gyrA*, codant pour la sous-unité A de la gyrase. Cet enzyme joue un rôle important dans la transcription et la division cellulaire chez les procaryotes. De ce fait, le gène *gyrA* est présent chez toutes les espèces bactériennes et possède un pourcentage d'identité de séquence élevé, autorisant la sélection d'une paire d'amorces permettant d'amplifier le gène chez toutes les espèces d'intérêt. Par ailleurs, il présente une hétérogénéité suffisante pour pouvoir sélectionner une sonde de détection spécifique pour chaque espèce.

1.1.2 Gènes cibles de détection de virulence

Les gènes cibles choisis sont des gènes codant pour des facteurs de virulence chez les espèces pathogènes d'intérêt. Ils ont été déterminés sur base des critères suivants :

- ✓ Le gène est propre au caractère pathogène de l'espèce
- ✓ Il est présent chez la majorité des souches pathogènes
- ✓ On retrouve une grande homologie de séquence parmi les souches
- ✓ Les séquences entre les divers gènes cibles sont suffisamment différentes

Afin de couvrir au maximum la virulence des différentes espèces identifiées, deux gènes ont été choisis pour chaque espèce. Le rôle des protéines encodées par ces gènes dans le mécanisme de pathogénicité des bactéries a été largement développé dans l'introduction. Les marqueurs sélectionnés sont repris dans le tableau ci-dessous :

Espèce bactérienne	Gène cible	Protéine encodée par le gène
<i>Vibrio cholerae</i>	Gène <i>ctxA</i>	Cholera toxin
	Gène <i>hlyA</i>	Hemolysin
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gène <i>tdh</i>	Thermostable Direct Hemolysin
	Gène <i>trh1, trh2</i>	Tdh Related Hemolysin
<i>Vibrio vulnificus</i>	Gène <i>vvhA</i>	Hemolysin
	Gène <i>viuB</i>	Siderophore

Tableau 1 - Gènes de virulence sélectionnés pour la biochips de virulence

1.2 Constitution d'une banque génomique.

Afin de disposer du matériel nécessaire au développement de la biochip ainsi qu'aux tests de spécificité, une banque de 24 échantillons d'ADN génomique de *Vibrio* a été constituée (Tableau 2). Cette banque comprend 10 souches de *V. cholerae*, 6 souches de *V. parahaemolyticus* et 3 souches de *V. vulnificus* ainsi que 5 autres espèces appartenant à la famille des Vibrionacées (*Photobacterium angustum*, *V. campbelli*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus* et *V. metschnikovii*). L'utilisation de ces échantillons permettra notamment de vérifier si l'outil de détection développé est suffisamment puissant pour permettre une identification au niveau des souches.

Souches	Espèce	Souches	Espèce
S1	<i>V. cholerae</i>	S2	<i>V. parahaemolyticus</i>
S5	<i>V. cholerae</i>	S3	<i>V. parahaemolyticus</i>
S14	<i>V. cholerae</i>	S10	<i>V. parahaemolyticus</i>
S15	<i>V. cholerae</i>	S22	<i>V. parahaemolyticus</i>
S16	<i>V. cholerae</i>	S23	<i>V. parahaemolyticus</i>
S17	<i>V. cholerae</i>	S24	<i>V. parahaemolyticus</i>
S18	<i>V. cholerae</i>		
S19	<i>V. cholerae</i>	S8	<i>Photobacterium angustum</i>
S19bis	<i>V. cholerae</i>	S9	<i>V. campbelli</i>
S20	<i>V. cholerae</i>	S11	<i>V. mimicus</i>
		S32	<i>V. alginolyticus</i>
S4	<i>V. vulnificus</i>	S33	<i>V. metschnikovii</i>
S6	<i>V. vulnificus</i>		
S7	<i>V. vulnificus</i>		

Tableau 2 – Liste des souches constituant la banque d'ADN génomique établie pour réaliser les différents tests lors de la mise au point de la biochip.

1.3 Mise au point des paramètres des deux PCR.

1.3.1 Sélection des amorces

De façon générale, les amorces utilisées répondent à différents critères. Premièrement, elles ont été choisies de manière à amplifier des fragments de petites tailles. Elles ont également été sélectionnées de façon à éviter la formation de structures secondaires trop stables telles que des structures en "épingle". Enfin, dans l'optique de la mise au point d'une PCR multiplexe, les amorces retenues devaient présenter une température de fusion (T_m) similaire.

Les températures de fusion ainsi que la stabilité des différentes structures formées peuvent notamment être vérifiées grâce au logiciel "Oligo 6". Les structures secondaires et les dimères d'amorces sont analysés sur base de la variation d'énergie libre (ΔG), dont la valeur limite a été fixée arbitrairement à -8 kcal/mol. Sous cette valeur, les structures secondaires et les dimères d'amorces sont jugés trop stables. Un exemple de résultat obtenu grâce au logiciel "Oligo6" est montré ci-dessous.

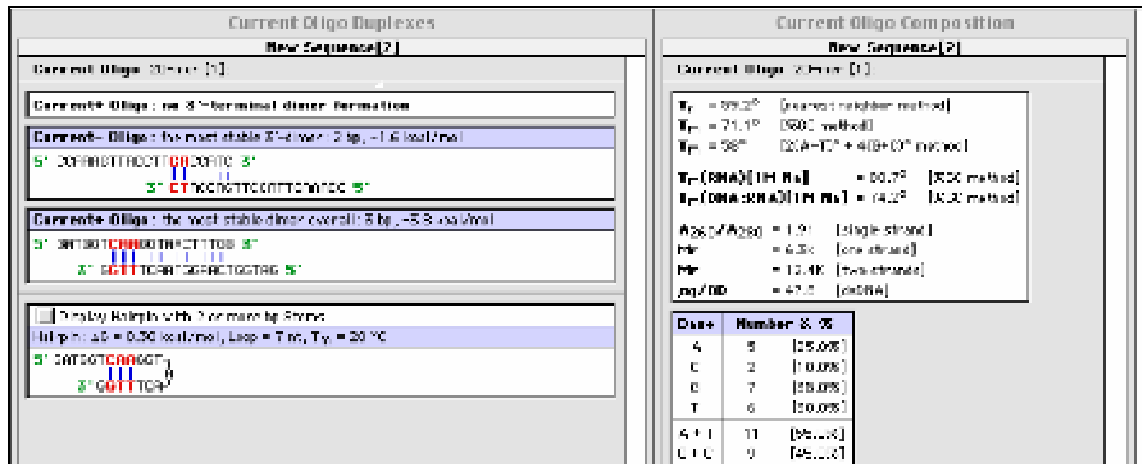


Figure 1 - Exemple de résultats obtenus grâce au programme Oligo6 pour la sélection des amorces.
 A gauche sont données les valeurs d'énergie libre des différents duplex et structures en épingle potentiels.
 A droite, le tableau reprend différents paramètres de Tm et de composition en nucléotides.

1.3.1.1. Amorces consensus.

Suite à un travail d'alignement de séquences connues de la sous-unité A de la gyrase de différentes espèces bactériennes, un couple d'amorces a été sélectionné dans les régions les plus conservées, permettant l'amplification de la séquence cible chez toutes les espèces d'intérêt. Le fragment amplifié grâce à ces amorces est d'une longueur de 229 paires de base pour les trois espèces de *Vibrio*.

Les caractéristiques des amorces sélectionnées sont reprises dans le tableau suivant :

Amorce	Sens Antisens	Tm	Dimères (kcal/mol)	Hairpin (kcal/mol)	Séquence de l'amorce
AHPgyr2	Sens	58°C	-3,8	0,3 (20°C)	5' - GATGGTCAAGGTAACCTTGG - 3'
AHPgyr5	Antisens	60°C	-5	-0,1 (26°C)	5' - GGAATGTTGGTTGCCATACC - 3'

Tableau 3 - Caractéristiques des amorces permettant l'amplification du marqueur gyrase chez les différentes espèces d'intérêt.

1.3.1.2. Amorces de virulence

Pour chaque gène cible, un travail préliminaire d'alignement de séquences théoriques de différentes souches pour chacune des 3 espèces de *Vibrio* a été effectué afin de choisir les amorces dans les régions les plus conservées. Il est à noter que ces différentes amorces seront présentes dans une même solution PCR et pourraient dès lors former entre elles des dimères d'amorces défavorables au bon déroulement de la PCR. Il a donc fallu tenir compte de ce paramètre lors de la détermination des amorces. Une paire d'amorces a été sélectionnée pour chaque gène, à l'exception des gènes *tdh* et *trh*, spécifiques du caractère virulent de *V. parahaemolyticus*. En effet, le pourcentage d'identité de séquence entre ces deux gènes a permis la sélection d'une paire d'amorces commune. Celles-ci ont ensuite été analysées grâce au programme "Oligo6" en ce qui concerne la température de fusion ainsi que la formation de structures secondaires et de dimères d'amorces. Les caractéristiques des amorces sélectionnées ainsi que les tailles attendues pour les amplicons sont reprises dans le tableau suivant :

Espèce	Amorce	T _m	Dimères (kcal/mol)	Hairpin (kcal/mol)	Séquence	Taille amplicon
<i>V. cholerae</i>	AHPctx1S	58°C	-6,8	1,6	5' - ACAGAGTGAGTACTTTGACC - 3'	309 pb
	AHPctx2A	54°C	-6,5	-0,7	5' - ATACCATCCATATATTTGGGAG - 3'	
	AHPPhly1S	62°C	-6,7	-2,6	5' - GACTCCTCGGTCAATATCCG - 3'	295 pb
	AHPPhly2A	60°C	-6,3	1	5' - CCGAGCTGGTCATAGATGAA - 3'	
<i>V. vulnificus</i>	AHPvvh1S	58°C	-3,6	0,9	5' - AACTTCAAACCGAACTATGAC - 3'	346 pb
	AHPvvh2A	56°C	-3,6	0,8	5' - TTCCAAGTCCGTGACAGC - 3'	
	AHPviuB1S	56°C	-3,1	/	5' - GGTGGGGCACTAAAGGCAG - 3'	334 pb
	AHPviuB2A	54°C	-3,6	/	5' - GCGATAAAAGCAGACAGCG - 3'	
<i>V. parahaemolyticus</i>	AHPtdrh1S	54°C	-3,6	/	5' - TGACTTCTGGACAAACCG - 3'	292 pb
	AHPtdrh2A	56°C	-1,9	/	5' - ATTCTGGAGTTTCATCTAAATA - 3'	

Tableau 4 - Caractéristiques des amorces permettant l'amplification des marqueurs de virulence sélectionnés pour les trois espèces de *Vibrio*

1.3.2 Optimisation des conditions PCR

Les paramètres influençant l'efficacité de la PCR sont la température, qui varie selon la température de fusion des amorces choisies, et la salinité (concentration en MgCl₂). Les conditions de salinité, mises au point précédemment, ont montré des résultats optimaux à une concentration de 4 mM en MgCl₂ (résultats non montrés). Deux températures d'hybridation des amorces ont quant à elles été testées (52°C et 55°C). Mis à part ce variant, la PCR a été réalisées suivant les conditions reprises en matériel et méthodes. Aucune différence notable n'a été observée entre les deux conditions de température. En effet, comme le montre la figure 2, l'amplification du marqueur hlyA montre une bande attendue de 300 pb dans les deux cas et ne présente pas de différence notable. Des résultats similaires ont été obtenus pour les autres marqueurs (résultats non montrés). Nous avons donc opté pour la température la plus élevée afin de favoriser la spécificité.

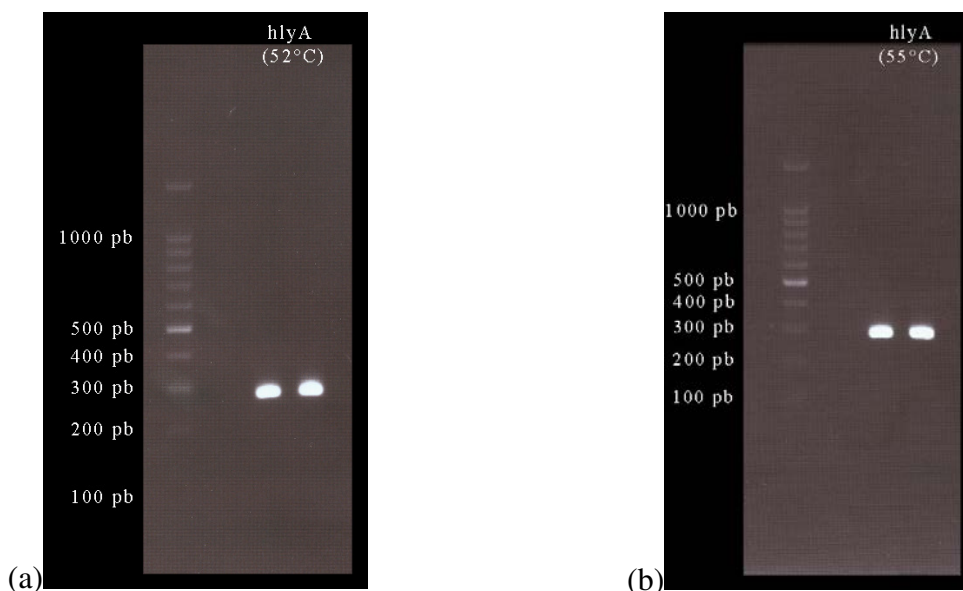


Figure 2 – Electrophorèse sur gel d'agarose 1% illustrant les tests de différentes températures d'hybridation. Cas du gène hlyA de *Vibrio cholerae* S1.
(a) 52°C (b) 55°C

```

VcholeraeS1      1 ..... .AGGTAACCTT TGGCTCGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VcholeraeS5      1 ..... ..GGTAACCTT TGGCTCGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VcholeraeS14     1 ..TGATGGTC ATGGTAACCTT TGGCTCGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VcholeraeS15     1 ..... ..CGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VcholeraeS16     1 ..... ..GGTAACCTT TGGCTCGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VcholeraeS17     1 ..... ..GGTAACCTT TGGCTCGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VcholeraeS18     1 ..... ..GGC
VcholeraeS19     1 ..... ..GGTAACCTT TGGCTCGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VcholeraeS20     1 ..... .C AAGGTAACCTT TGGCTCGATC GACGGCGACT CCGCGGCGGC AATGC
VparaS2          1 ...TGATGGA CAGGTAACCTT TGGCTCAATC GATGGCGACT CTGCTGCGGC AATGC
VparaS3          1 ..... ..GGTAA..TT TGGCTCAATC GATGGCGACT CTGCTGCGGC AATGC
VparaS10         1 ..... ..GGTAACCTT TGGCTCAATC GATGGCGACT CTGCTGCGGC AATGC
VparaS22         1 ..... ..GGTAACCTT TGGCTCAATC GATGGCGACT CTGCTGCGGC AATGC
VparaS23         1 ..... .TGGTAACCTT TGGCTCAATC GATGGCGACT CTGCTGCGGC AATGC
VparaS24         1 ..... ..GCGG.. AATGC
VvulnificusS4    1 ..... ..CGCAGC AATGC
VvulnificusS6    1 ..... ..GGTAACCTT TGGTTCGATC GATGGTGACT CCGCGGCGAGC AATGC
VvulnificusS7    1 ..... ..GGTAACCTT TGGTTCGATC GATGGTGACT CCGCGGCGAGC AATGC

VcholeraeS1      45 GTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACATTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS5      44 GTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS14     54 GTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS15     31 ATAAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS16     44 GTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS17     44 GTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS18     4 TTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS19     44 GTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VcholeraeS20     47 GTTAT ACCGAAGTTC GTATGTCGAA AATCGCGCAC GAACTCTTGG CAGACCTAGA
VparaS2          53 GTTAC ACCGAAGTAC GTATGGCAAA AATTGCCAC GAACCTTTGG CTGGCCTAGA
VparaS3          43 GTTAC ACCGAAGTAC GTATGGCAAA AATTGCCAC GAACCTTTGG CTGACCTAGA
VparaS10         44 GTTAC ACCGAAGTTC GTATGGCAAA AATTGCCAC GAACCTTTGG CTGACCTAGA
VparaS22         44 GTTAC ACCGAAGTTC GTATGGCAAA AATTGCCAC GAACCTTTGG CTGACCTAGA
VparaS23         45 GTTAC ACCGAAGTTC GTATGGCAAA AATTGCCAC GAACCTTTGG CTGACCTAGA
VparaS24         10 GTTAC ACCGAAGTAC GTATGGCAAA AATTGCCAC GAACCTTTGG CTGACCTAGA
VvulnificusS4    12 GTTAT ACCGAAGTTC GCATGGCGAA AATCGCCAC GAGCTTTTGG CTGACCTAGA
VvulnificusS6    44 GTTAT ACCGAAGTTC GCATGGCGAA AATCGCCAC GAGCTTTTGG CTGACCTAGA
VvulnificusS7    44 GTTAT ACCGAAGTTC GCATGGCGAA AATCGCCAC GAGCTTTTGG CTGACCTAGA

VcholeraeS1      100 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VcholeraeS5      99 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VcholeraeS14     109 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VcholeraeS15     86 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VcholeraeS16     99 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VcholeraeS17     99 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VcholeraeS18     59 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAAAITC CAGC
VcholeraeS19     99 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VcholeraeS20     102 CAAAGAAACC GTTGACTACG TTCCGAACTA TGACGGCACC GAGCAGATCC CTGC
VparaS2          108 CAAAGAAACC GTAGACTACG TACCTAACTA TGATGGTACA GAACAGATTCC CAGC
VparaS3          98 CAAAGAAACC GTAGACTACG TACCTAACTA TGATGGTACA GAACAGATTCC CAGC
VparaS10         99 CAAAGAAACC GTAGACTACG TACCTAACTA TGATGGTACA GAACAGATTCC CTGC
VparaS22         99 CAAAGAAACC GTAGACTACG TACCTAACTA TGATGGTACA GAACAGATTCC CAGC
VparaS23         100 CAAAGAAACC GTAGACTACG TACCTAACTA TGATGGTACA GAACAGATTCC CTGC
VparaS24         65 CAAAGAAACC GTAGACTACG TACCTAACTA TGATGGTACA GAACAGATTCC CAGC
VvulnificusS4    67 TAAAGAAACC GTGGATTACG TGCCGAACTA TGACGGTACA GAACAGATCC CAGC
VvulnificusS6    99 TAAAGAAACC GTGGATTACG TACCAACTA TGACGGTACA GAACAGATCC CTGC
VvulnificusS7    99 TAAAGAAACC GTGGATTACG TGCCGAACTA TGACGGTACA GAACAGATCC CAGC

VcholeraeS1      154 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGTTCATCC GGTATAGCC
VcholeraeS5      153 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATAGCA
VcholeraeS14     163 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATAGCA
VcholeraeS15     140 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATAGCA
VcholeraeS16     153 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATTGGC
VcholeraeS17     153 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATAGCA
VcholeraeS18     113 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATAGCA
VcholeraeS19     153 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATTGGC
VcholeraeS20     156 GGTATT GCGACAAAG ATCCCGAACC TGCTGATCAA CGGCGCATCT GGTATTGGC
VparaS2          162 GGTTCCT TC..AACCAA .....
VparaS3          152 GGTTCCT TCCAACCAA AITCCAAACC TATTGGTAAA CGGTGCTTCT GGTATAGCG
VparaS10         153 GGTTCCT TCCAACCAA AITCCAAACC TATTGGTCAA CGGTGCTTCT GGTATAGCA
VparaS22         153 GGTTCCT TCCAACCAA AITCCAAACC TATTGGTCAA CGGTGCTTCT GGTATGCGA
VparaS23         154 GGTTCCT TCCAACCAA AITCCAAACC TATTGGTCAA CGGTGCTTCT GGTATAGCA
VparaS24         119 GGTTCCT TCCAACCAA AITCCAAACC TATTGGTAAA CGGTGCTTCT GGTATAGCC
VvulnificusS4    121 GGTTCCT TCCTACGAAA AITCCAAACC TGCTGGTCAA CGGTTCCTCC GGTATAGCA
VvulnificusS6    153 GGTTCCT TCCTACGAAA AITCCAAACC TGCTGGTCAA CGGTTCCTCC GGCATCGCA
VvulnificusS7    153 GGTTCCT TCCTACGAAA AITCCAAACC TGCTGGTCAA CGGTTCCTCC GGTATCGCA

VcholeraeS1      209 G TGGGTATGGC AACCC.....
VcholeraeS5      208 G TGGGTATGGC AAACA.....
VcholeraeS14     218 G TGGGTATGGC AC.....
VcholeraeS15     195 G TGGGTATGGC AC.....
VcholeraeS16     208 G TGGGTATGGC AACCACATT CCACCA.
VcholeraeS17     208 G TGGGTATGGC A.....
VcholeraeS18     168 G TGGGTATGGC ACAC.....
VcholeraeS19     208 G TGGGTATGGC AACCACATT CCATCC.
VcholeraeS20     211 G TGGGTATGGC AACCACATT CCAC...
VparaS2          .
VparaS3          207 T GGGTATGGCA CCC.....
VparaS10         208 G TGGGTATGGC AC.....
VparaS22         208 T GGGTATGGCA .....
VparaS23         209 G TGGGTATGGC A.....
VparaS24         174 G TGGGTATGGC ACC.....
VvulnificusS4    176 G TGGGTATGGC ACC.....
VvulnificusS6    208 G TAGGTATGGC AACCACATT CCATCCA
VvulnificusS7    208 G TAGGTATGGC AACCACATT CCA....

```

Figure 4 - Alignement des séquences "gyrase" obtenues suite à l'amplification et au séquençage de ce gène pour les différentes souches testées. En rouge sont indiqués les nucléotides conservés d'une séquence à l'autre. En noir et en bleu apparaissent les mutations ponctuelles entre séquences.

Les conditions PCR ainsi optimisées sont identiques pour les deux PCR développées et sont décrites au point 1.3 du matériel et méthode.

1.4 Amplification des gènes cibles.

Afin de contrôler l'efficacité d'amplification des gènes cibles, les différentes amorces sélectionnées ont été testées sur les échantillons de la banque génomique. Tout un travail de séquençage a également été réalisé suite à ces amplifications afin d'une part de vérifier que la séquence amplifiée correspondait bien à la séquence attendue, et d'autre part d'obtenir un maximum d'informations quant à la présence probable de mutations ponctuelles au sein des différentes souches d'une même espèce. Ces informations ont permis de compléter une base de données préalablement établie à partir des séquences théoriques. Il est important de disposer d'une base de données la plus complète possible afin de pouvoir déterminer une sonde qui permette de détecter un maximum de souches de l'espèce d'intérêt avec un maximum de spécificité.

1.4.1 Amplification du marqueur gyrase

La PCR réalisée pour l'amplification du marqueur gyrase est de type simplexe et génère un amplicon de 229 pb. Afin de vérifier le bon fonctionnement de la PCR, les produits d'amplification ont été déposés sur gel d'agarose 1% et révélés aux rayons UV. En parallèle, nous avons fait migrer un marqueur de poids moléculaire afin de vérifier la taille de l'amplicon obtenu.

La figure 3 montre un exemple d'amplification du marqueur gyrase pour les trois espèces de *Vibrio*. Comme attendu, un fragment spécifique de taille comprise entre 200 et 300 paires de base est amplifié lors de la PCR simplexe. Des résultats similaires ont été obtenus pour les 24 souches testées.

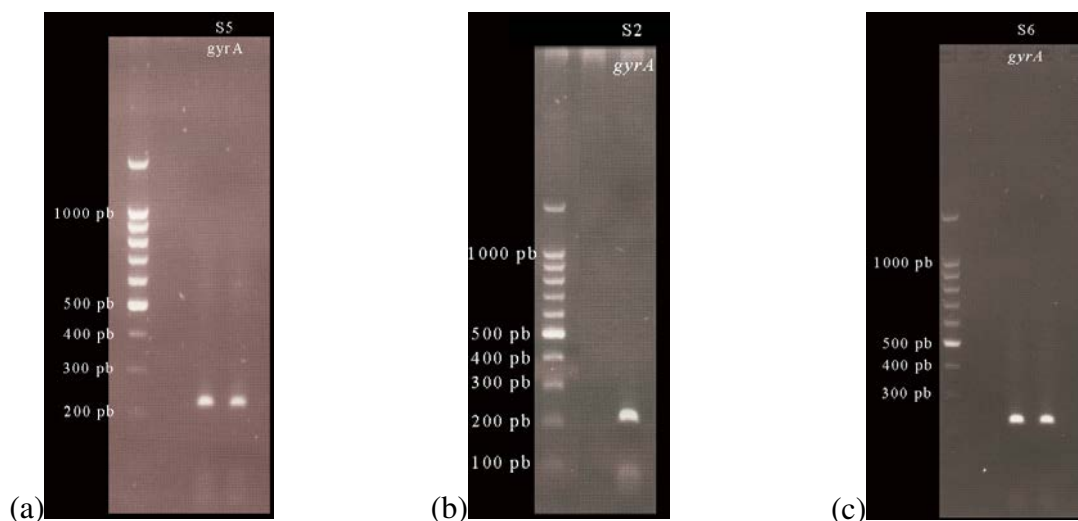


Figure 3 - Electrophorèse sur gel d'agarose 1% après amplification du marqueur gyrase par PCR non biotinylée pour les trois espèces de *Vibrio*.

(a) *Vibrio cholerae* (b) *Vibrio parahaemolyticus* (c) *Vibrio vulnificus*

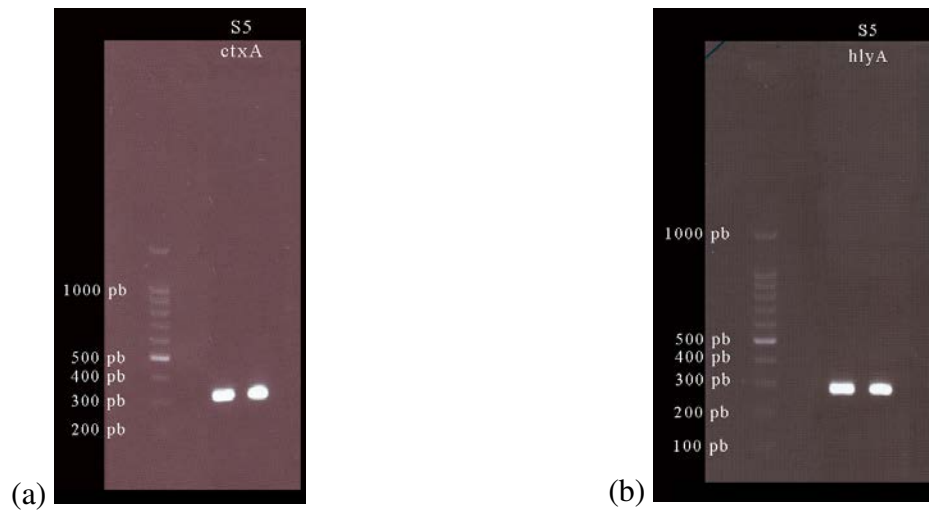


Figure 5 – Electrophorèse sur gel d'agarose 1% : amplicons obtenus par PCR simplexe non biotinylée sur l'ADN génomique de *Vibrio cholerae* S5 pour les marqueurs de virulence *ctxA* (a) et *hlyA* (b)

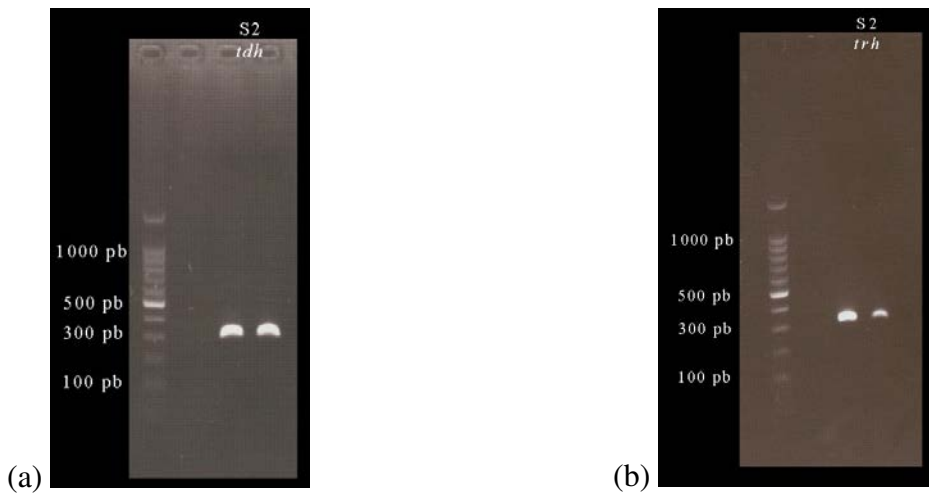


Figure 6 - Electrophorèse sur gel d'agarose 1% : amplicons obtenus par PCR simplexe non biotinylée sur l'ADN génomique de *Vibrio parahaemolyticus* S2 pour les marqueurs de virulences *tdh* (a) et *trh* (b)

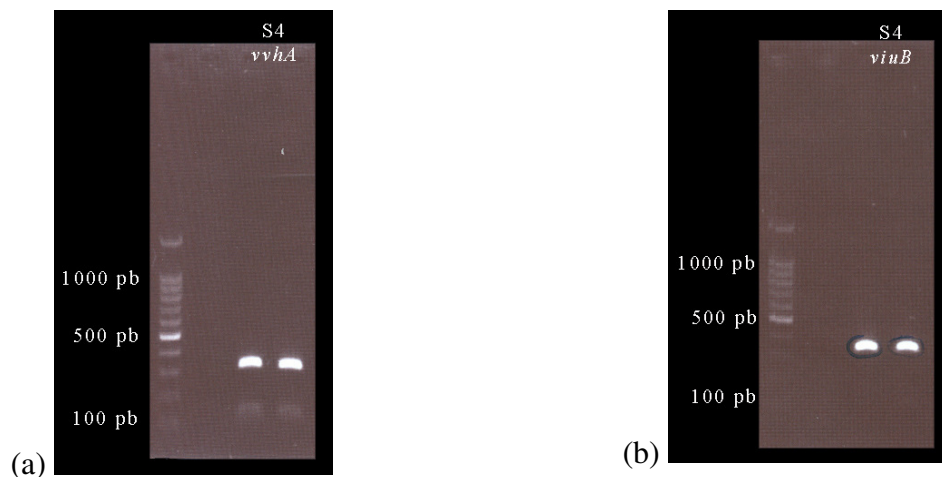


Figure 7 - Electrophorèse sur gel d'agarose 1% : amplicons obtenus par PCR simplexe non biotinylée sur l'ADN génomique de *Vibrio vulnificus* S4 pour les marqueurs de virulences *vvhA* (a) et *viuB* (b)

Après amplification et migration, les échantillons d'ADN ont été récupérés, purifiés et séquencés selon la méthode décrite au point 4 du matériel et méthodes. Le séquençage a permis de confirmer les séquences attendues pour les 24 souches. Celles-ci ont ensuite été alignées grâce aux logiciels "ClustalW" et "Boxshade 3.21", ce qui a permis de constater la bonne conservation de séquence entre les souches de chaque espèce, ainsi que les zones variables d'une espèce à l'autre, permettant la sélection des sondes spécifiques (fig. 4).

1.4.2 Amplification des marqueurs de virulence

1.4.2.1 PCR simplexe

Afin de tester l'efficacité des amorces et de séquencer les produits PCR obtenus, les marqueurs de virulence ont tout d'abord été amplifiés lors d'une PCR de type simplexe. Les conditions d'amplification sont celles décrites au point 1.3 en matériel et méthodes. Des exemples des résultats obtenus pour chaque espèce sont présentés aux figures 5, 6 et 7. Un fragment spécifique de taille attendue de 300 pb est visible pour les gènes *ctxA* (fig. 5a) et *hlyA* (fig. 5b) de la souche *V. cholerae* S5, pour les gènes *tdh* (fig. 6a) et *trh* (fig. 6b) de la souche *V. parahaemolyticus* S2 ainsi que pour les gènes *vvhA* (fig. 7a) et *viuB* (fig. 7b) de la souche *V. vulnificus* S4. Les 20 souches de *Vibrio* ont ainsi pu être toutes caractérisées par PCR.

Suite à l'amplification et à la migration, les bandes de taille attendue ont été récupérées sur gel afin d'être séquencées. Le séquençage des différentes souches de *V. cholerae* a confirmé les résultats obtenus par PCR, de même que pour les trois souches de *V. vulnificus*. En ce qui concerne les souches de *V. parahaemolyticus*, les résultats obtenus par séquençage correspondent à ce qui a été observé en PCR. Les souches positives pour le gène *trh* ont pu être caractérisées plus précisément grâce au séquençage. Les souches S2 et S24 sont porteuses du gène *trh1*, tandis que les souches S10 et S23 sont porteuses du gène *trh2*. Un récapitulatif des résultats obtenus est présenté au tableau 5.

1.4.2.2 PCR multiplexe

Une fois l'efficacité des 5 paires d'amorces vérifiée, l'étape suivante consistait à tester l'amplification de toutes ces séquences cibles en une seule et même PCR multiplexe. Mis à part la présence des 10 amorces permettant l'amplification de tous les gènes de virulence, les conditions PCR sont les mêmes que celles utilisées pour l'amplification du marqueur gyrase.

L'utilisation des 5 paires d'amorces dans une seule et même PCR ne nuit pas à l'efficacité de celle-ci, bien que dans certains cas, des bandes aspécifiques de plus faible intensité semblent apparaître. En effet, un fragment de taille attendue (de l'ordre de 300 pb) est visible pour chacune des trois espèces de *Vibrio* (fig. 8a, b, c). Pour la suite des expériences, la PCR de virulence sera toujours effectuée en multiplexe.

Souches	Espèce	Détection espèce		Détection virulence	
		PCR	Séquençage	PCR	Séquençage
S1	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> -/ <i>hlyA</i> +	<i>hlyA</i> +
S5	<i>v. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S14	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S15	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S16	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S17	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S18	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> -/ <i>hlyA</i> +	<i>hlyA</i> +
S19	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S19bis	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S20	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +	<i>ctxA</i> +// <i>hlyA</i> +
S4	<i>V. vulnificus</i>	ok	ok	<i>vvhA</i> +// <i>viuB</i> +	<i>vvhA</i> +// <i>viuB</i> +
S6	<i>V. vulnificus</i>	ok	ok	<i>vvhA</i> +// <i>viuB</i> +	<i>vvhA</i> +// <i>viuB</i> +
S7	<i>V. vulnificus</i>	ok	ok	<i>vvhA</i> -/ <i>viuB</i> -	/
S2	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	<i>tdh</i> +// <i>trh</i> +	<i>trh1</i> +
S3	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	<i>tdh</i> -/ <i>trh</i> -	/
S10	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	<i>tdh</i> -/ <i>trh</i> +	<i>trh2</i> +
S22	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	<i>tdh</i> -/ <i>trh</i> -	/
S23	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	<i>tdh</i> -/ <i>trh</i> +	<i>trh2</i> +
S24	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	<i>tdh</i> +// <i>trh</i> +	<i>tdh</i> +// <i>trh1</i> +
S8	<i>Photobacterium angustum</i>	ok	ok	/	/
S9	<i>V. campbellii</i>	ok	ok	amplification	
S11	<i>V. mimicus</i>	ok	ok	amplification	
S32	<i>V. alginolyticus</i>	ok	ok	/	/
S33	<i>V. metschnikovii</i>	ok	ok	/	/

Tableau 5 – Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des tests des deux PCR non biotinylées consensus "gyrase" et simplexe "virulence" et du séquençage.

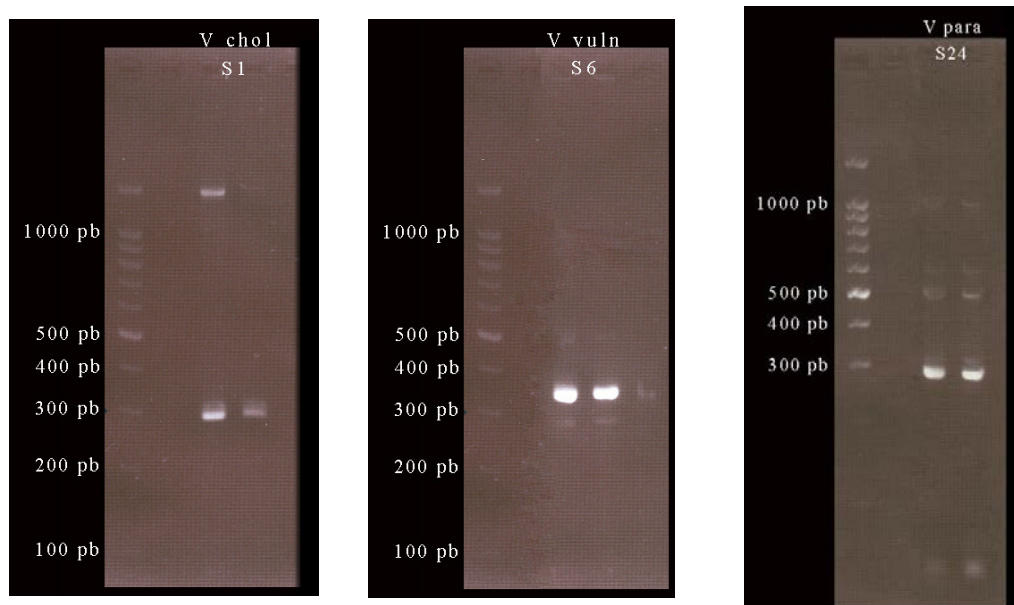


Figure 8 – Test de PCR multiplexe sur les trois espèces d'intérêt

(a) *V. cholerae*

(b) *V. Vulnificus*

(c) *V. parahaemolyticus*

2. Élaboration de la biochips permettant la détection des trois espèces *Vibrio* et de leur caractère virulent.

Les PCR consensus "gyrase" et multiplexe "virulence" préalablement mises au point ont permis l'amplification et le marquage des séquences cibles qui, par la suite, ont été hybridées sur un damier à ADN présentant des sondes de capture spécifiques aux séquences amplifiées. La sélection de ces sondes de capture a pu être réalisée grâce aux bases de données de chaque gène cible, auparavant enrichies par tout un travail de séquençage. Deux stratégies ont été utilisées pour la recherche des sondes de capture.

2.1 Sélection des sondes de captures spécifiques.

2.1.1 Détection de l'espèce : gyrase

La sous-unité A de la gyrase étant un enzyme présent chez toutes les espèces bactériennes, la séquence théorique de ce gène est connue pour de nombreuses espèces. Une base de données locale constituée de 105 séquences a donc pu être établie, base de données contenant les séquences théoriques connues complétée par les résultats du séquençage. Cette base comporte, en plus des séquences de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, les séquences d'autres espèces proches appartenant à la famille des *Vibrionaceae* ainsi que d'espèces potentiellement présentes dans des échantillons alimentaires.

La base de données locale établie a été utilisée pour rechercher les séquences trappeurs à spotter sur les lames. Pour cela, un outil bioinformatique développé par les facs a été exploité (BioXProbes). Ce programme est capable de rechercher des sondes spécifiques en alignant un grand nombre de séquences. Plus la base de données est importante, plus les sondes de capture seront spécifiques aux espèces à identifier. Une série de séquences candidates a été sélectionnée sur base des 3 critères suivants :

- ✓ le nombre de substitutions entre chaque sonde doit être supérieur à trois afin d'éviter des hybridations croisées.
- ✓ la température de fusion doit être similaire pour chaque sonde afin de pouvoir fixer une température d'hybridation commune.
- ✓ les sondes sont choisies afin d'éviter au maximum la formation d'épingles à cheveux et/ou de duplex entre les trappeurs.

Ces séquences ont ensuite été analysées grâce au programme "Oligo6", afin de déterminer la sonde la plus appropriée, sur base des valeurs d'énergie libre de potentiels duplex ou hairpins ainsi que la température de fusion. Les différentes caractéristiques des sondes retenues sont résumées dans le tableau suivant :

Espèces	Trappeur	Position	Direction	Tm	Duplex (kcal/mol)	Hairpin (kcal/mol)	Minimum substitution	Séquence
<i>V.cholerae</i>	VcholG1	66	antisens	76°C	-10,3	-0,7	3 (<i>V.mimicus</i>)	GAAAATCGCGCACGAACCTCTGGCA
<i>V.parahaemolyticus</i>	VparG1	141	sens	76°C	-3,6	1,1	3 (<i>V.vul</i> , <i>Valg</i> , <i>Vmet</i>)	ACAGATTCAGCGGTTCTTCAACC
<i>V.vulnificus</i>	VvulG1	107	antisens	74°C	-6,2	-0,5	3 (<i>V.campbelli</i>)	TAAAGAAACCGTGGATTACGTGCCG

Tableau 6 - Caractéristiques des sondes permettant la détection spécifique des trois espèces de *Vibrio*.

2.1.2 Détection de la virulence

Dans le cas des gènes de virulence, la recherche de sondes s'est réalisée manuellement sur base des alignements établis précédemment. En effet, il s'agit ici de gènes spécifiques de l'espèce à caractériser pour lesquels on ne retrouve pas de séquence ayant une homologie suffisante chez d'autres espèces pour être détectée par la même sonde. L'utilisation de l'outil bioinformatique, qui s'appuie sur la comparaison de la séquence d'intérêt avec des séquences proches, n'a donc plus cours ici. Toutefois, un "Blast" (Basic Local Alignment Search Tool) a été réalisé sur toutes les sondes choisies afin de vérifier qu'il n'y ait pas de similarité avec une quelconque séquence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Lors de la recherche des sondes, nous avons veillé à ce que celles-ci se situent dans une zone conservée entre les différentes souches. Les critères de sélection sont identiques à ceux utilisés pour le marqueur gyrase :

- ✓ le nombre de substitutions par rapport aux autres espèces est supérieur à trois afin d'éviter des hybridations croisées.
- ✓ la température de fusion des différentes sondes est similaire.
- ✓ les sondes sont choisies afin d'éviter au maximum la formation d'épingles à cheveux et/ou de duplex entre les trappeurs.

Les températures de fusion ainsi que les énergies libres d'éventuels dimères ou épingles à cheveux ont été vérifiées grâce au logiciel "Oligo 6" (tableau 7). Finalement, une sonde par gène cible a été choisie, à l'exception du gène *trh* qui, présentant deux variants, est quant à lui détecté par deux sondes spécifiques différentes. Les caractéristiques des sondes retenues sont reprises dans le tableau suivant :

Espèces	Trappeur	Position	Direction	Tm	Duplexe	Hairpin	Séquence
					(kcal/mol)	(kcal/mol)	
V.cholerae	AHTctx1	57	antisens	56°C	-3,6	2	5' - GCAAGAGGAACTCAGACGGGATTIG - 3'
	AHTthy1	238	sens	56°C	-6,2	/	5' - GCCAATACGTCGATAGCCAGCAA - 3'
V.vulnificus	AHTvwh1	66	antisens	56°C	-3,6	1,7	5' - GAGATGGGCGTGAAACTCAACTATC - 3'
	AHTviuB1	259	sens	54°C	-8,5	0,9	5' - AATCCTCATGATGCCGAGCCCGCA - 3'
V.parahaemolyticus	AHTtrh11	59	antisens	48°C	-3,6	/	5' - TCTATTTTCACGACTTCAGGCTCAAAA - 3'
	AHTtrh21	45	antisens	50°C	-3,6	/	5' - ATGTTATACGGTCAATCGGTTTCACA - 3'
	AHTdhl	62	antisens	46°C	-3,1	1,4	5' - AAGATGTTTATGGTCAATCAGTATTCAC - 3'

Tableau 7 - Caractéristiques des sondes de détection des marqueurs de virulence

2.2 Design de la biochips

Une fois les sondes déterminées, celles-ci ont été "spottées" sur les lames selon le schéma suivant :

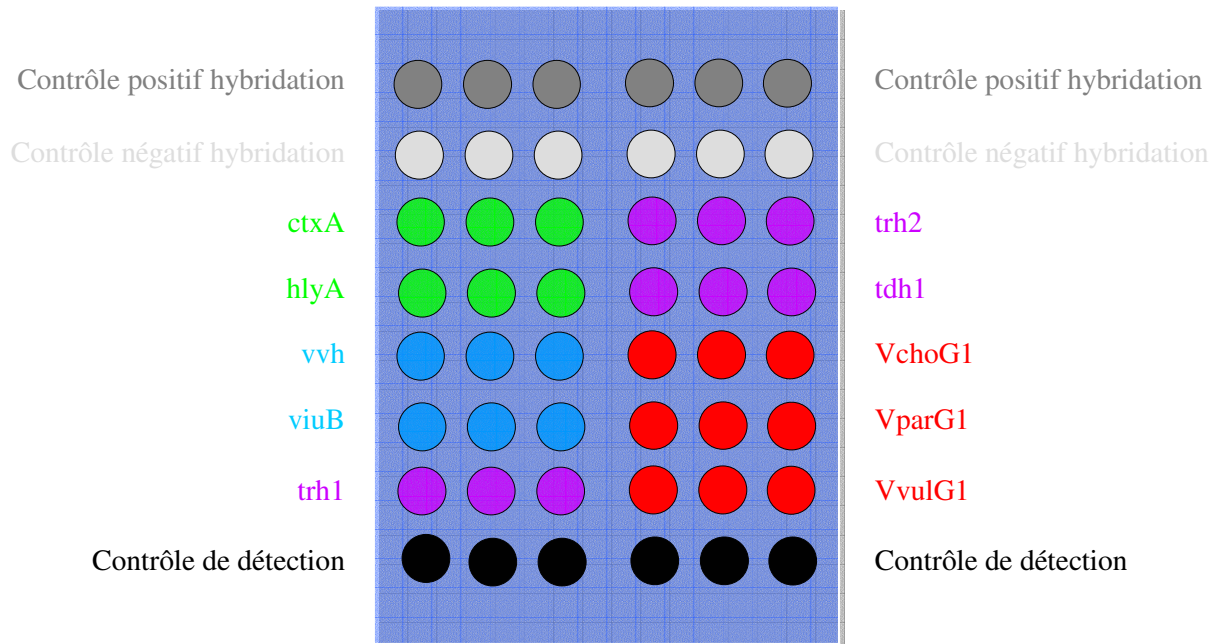


Figure 9– Design du damier à ADN

Au total, le damier est constitué de 10 sondes de captures spécifiques, toutes présentes en triplicat : 3 sondes pour détecter *V.cholerae* (VchoG1, ctxA, hlyA), 4 sondes pour la détection de *V.parahaemolyticus* (VparG1, trh1, trh2, tdh) et 3 sondes pour *V.vulnificus* (VvulG1, vvh, viuB). En plus des sondes spécifiques de détection des marqueurs gyrase et de virulence, trois contrôles sont présents, chacun en six exemplaires :

- (1) **Contrôle positif hybridation** : un ADN cible de séquence connue, complémentaire de la sonde de contrôle, est ajouté au niveau du mélange après PCR. Ce contrôle permet de vérifier l'absence d'éventuels problèmes d'hybridation.
- (2) **Contrôle négatif hybridation** : il s'agit d'une sonde n'ayant aucun ADN complémentaire dans les échantillons. Ce contrôle témoigne de la présence ou de l'absence d'hybrides non spécifiques.
- (3) **Contrôle de fixation/détection** : une séquence d'ADN préalablement biotinylée est directement fixée sur la lame. Si ce contrôle ne donne aucun signal, on peut supposer un problème au niveau de la détection ou de la fixation des ADN trappeurs.

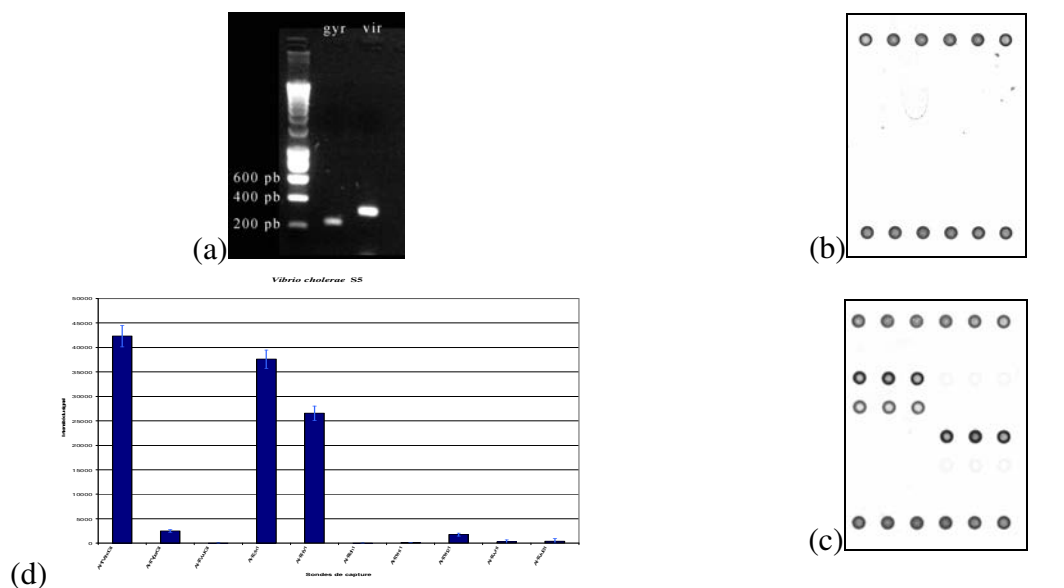


Figure 10 - Résultats d'hybridation pour l'espèce *Vibrio cholerae* (souche S5).

- Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des amplicons obtenus par PCR biotinylée sur l'ADN génomique de *V. cholerae* (souche S5) : gyrase et virulence
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant du blanc PCR effectué lors de la PCR sur l'ADN génomique de *V. cholerae* (souche S5)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant des deux PCR gyrase et virulence effectuées sur l'ADN génomique de *V. cholerae* (souche S5)
- Représentation graphique de l'intensité des signaux obtenus après hybridation pour chacune des sondes spécifiques.

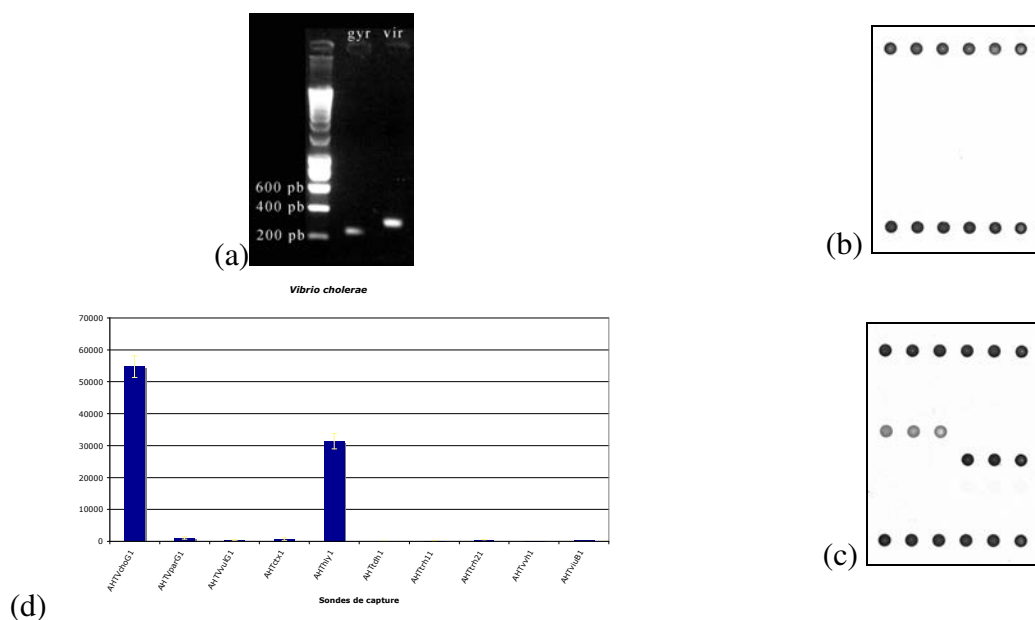


Figure 11 - Résultats d'hybridation pour l'espèce *Vibrio cholerae* (souche S1).

- Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des amplicons obtenus par PCR biotinylée sur l'ADN génomique de *V. cholerae* (souche S1) : gyrase et virulence
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant du blanc PCR effectué lors de la PCR sur l'ADN génomique de *V. cholerae* (souche S1)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant des deux PCR gyrase et virulence effectuées sur l'ADN génomique de *V. cholerae* (souche S1)
- Représentation graphique de l'intensité des signaux obtenus après hybridation pour chacune des sondes spécifiques.

2.3 Détection des ADN cibles par hybridation.

Pour rappel, les échantillons d'ADN ont été préalablement amplifiés et marqués par des dCTP et des dATP biotinylés lors d'une PCR simplexe pour le marqueur gyrase et multiplexe pour les marqueurs de virulence. Une partie des amplicons a été déposée sur gel d'agarose afin de s'assurer que la séquence cible a bien été amplifiée. Notons que même si les amplicons ne sont pas décelables sur gel, ils peuvent quand même être détectés par hybridation, la sensibilité de cette dernière étant plus importante que celle d'un gel d'agarose. La mise au point des conditions d'hybridation, consistant à tester la température d'hybridation et la concentration en sels, a été réalisée auparavant et n'a pas fait l'objet d'une optimisation dans le cadre de ce mémoire. La validation de la biochip est passée par plusieurs étapes. Les tests de spécificité permettent de vérifier que les sondes sont capables de lier les gènes d'intérêt sans se lier à d'éventuelles séquences contaminantes. Les tests de sensibilité ont ensuite permis de déterminer quelle concentration d'ADN cible peut être détectée dans les échantillons.

2.3.1 Hybridation sur damier des espèces d'intérêt.

Afin de tester la spécificité de la biochip, 10 souches de *V. cholerae*, 6 souches de *V. parahaemolyticus* et 3 souches de *V. vulnificus* ont été hybridées. Chaque produit de PCR a été hybridé trois fois, selon les conditions d'hybridation décrites en matériel et méthodes.

2.3.1.1 *Vibrio cholerae*

Pour rappel, toutes les souches testées ont donné un résultat positif pour le marqueur gyrase lors de l'amplification par PCR non biotinylée. Parmi les 10 souches testées, 8 souches ont été caractérisées hlyA+ /ctxA+. Les deux souches restantes (S1 et S18) sont quant à elles hlyA+ /ctxA- (tableau 5).

Le premier cas de figure est illustré par l'hybridation sur damier de la souche S5 de *V. cholerae* (fig. 10). Un dixième du volume des deux PCR biotinylées effectuées ont été déposés sur gel afin de s'assurer du bon déroulement de l'amplification (fig. 10a). En ce qui concerne l'hybridation de *V. cholerae* S5 proprement dit, un signal est observé pour les contrôles positifs d'hybridation et de détection. Inversement, aucun signal n'est détectable pour le contrôle négatif d'hybridation. Comme attendu, les sondes spécifiques gyrA, ctxA et hlyA sont détectées dans cet échantillon. En revanche, on observe une hybridation non spécifique au niveau de la sonde VparG1 (fig. 10c). Cependant, celle-ci reste faible en comparaison aux signaux obtenus pour les hybridations spécifiques, comme le montre le graphique d'intensité des signaux (fig. 10d). Lors de l'hybridation de *V. cholerae* S5, aucune contamination n'a pu être détectée pour le blanc PCR (fig. 10b), correspondant à la solution PCR dans laquelle l'ADN génomique a été remplacé par de l'eau en pièce PCR2. Ceci assure qu'aucune contamination des solutions PCR avec des amplicons issus d'une PCR préalable ne puisse venir fausser les résultats observés sur la chips. Des résultats similaires ont été obtenus pour les 8 souches testées.

Le deuxième cas de figure est représenté par l'hybridation de la souche S1. Les deux marqueurs gyrA et hlyA amplifiés lors de la PCR (fig. 11a) ont pu être spécifiquement détectés, comme le montre la figure 11c. Les blancs PCR hybridés en parallèle ne présentent aucune sonde positive mis à part les contrôles positifs de détection et d'hybridation (fig. 11b). Des résultats similaires ont été observés pour la souche S18. On voit donc que globalement, les tests d'hybridation confirment les résultats obtenus lors des PCR non biotinylées.

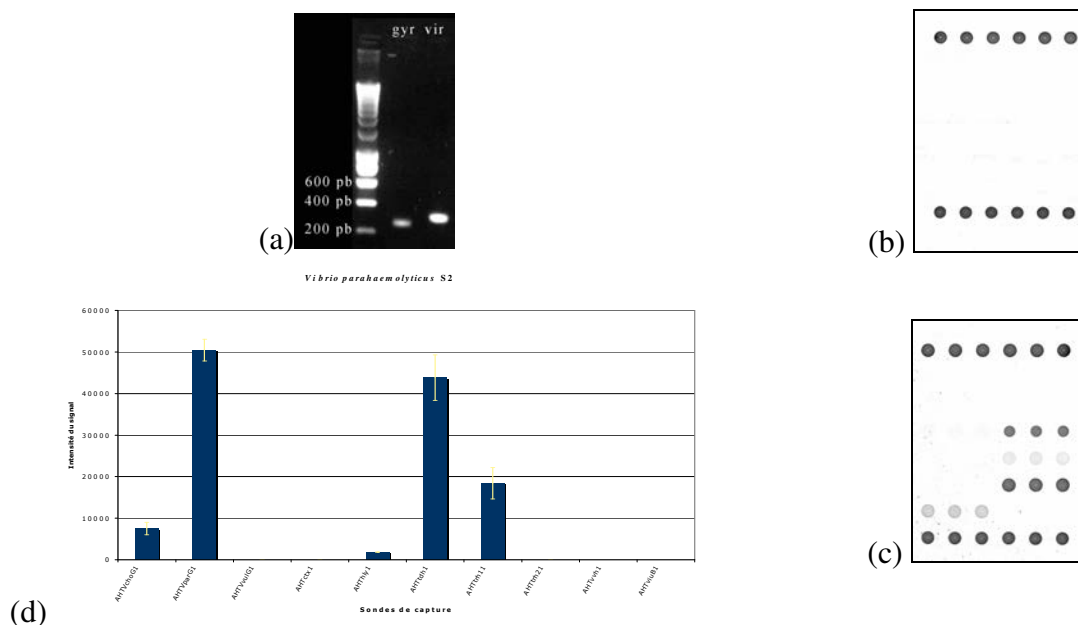


Figure 12 - Résultats d'hybridation pour l'espèce *V. parahaemolyticus* (souche S2).

- Électrophorèse sur gel d'agarose 1 % des amplicons obtenus par PCR biotinylée sur l'ADN génomique de *V. parahaemolyticus* (souche S2) : gyrase et virulence
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant du blanc PCR effectué lors de la PCR sur l'ADN génomique de *V. parahaemolyticus* (souche S2)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant des deux PCR gyrase et virulence effectuées sur l'ADN génomique de *V. parahaemolyticus* (souche S2)
- Représentation graphique de l'intensité des signaux obtenus après hybridation pour chacune des sondes spécifiques

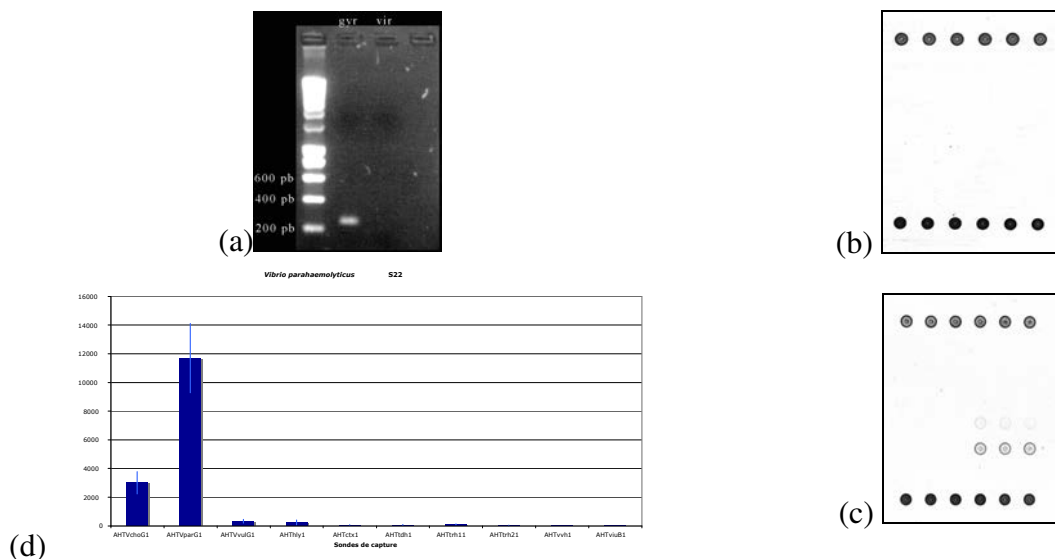


Figure 13 - Résultats d'hybridation pour l'espèce *V. parahaemolyticus* (souche S22).

- Électrophorèse sur gel d'agarose 1 % des amplicons obtenus par PCR biotinylée sur l'ADN génomique de *V. parahaemolyticus* (souche S22) : gyrase et virulence
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant du blanc PCR effectué lors de la PCR sur l'ADN génomique *V. parahaemolyticus* (souche S22)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant des deux PCR gyrase et virulence effectuées sur l'ADN génomique de *V. parahaemolyticus* (souche S22)
- Représentation graphique de l'intensité des signaux obtenus après hybridation pour chacune des sondes spécifiques

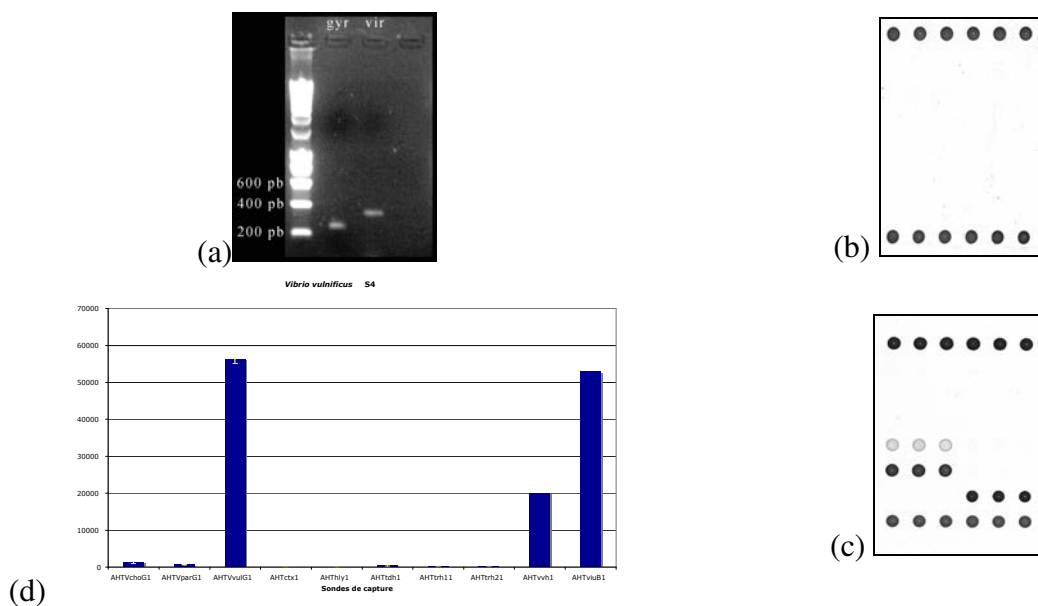


Figure 14 - Résultats d'hybridation pour l'espèce *V. vulnificus* (souche S4).

- Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des amplicons obtenus par PCR biotinylée sur l'ADN génomique de *V. vulnificus* (souche S4)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant du blanc PCR effectué lors de la PCR sur l'ADN génomique de *V. vulnificus* (souche S4)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant des deux PCR gyrase et virulence effectuées sur l'ADN génomique de *V. vulnificus* (souche S4)
- Représentation graphique de l'intensité des signaux obtenus après hybridation pour chacune des sondes spécifiques.

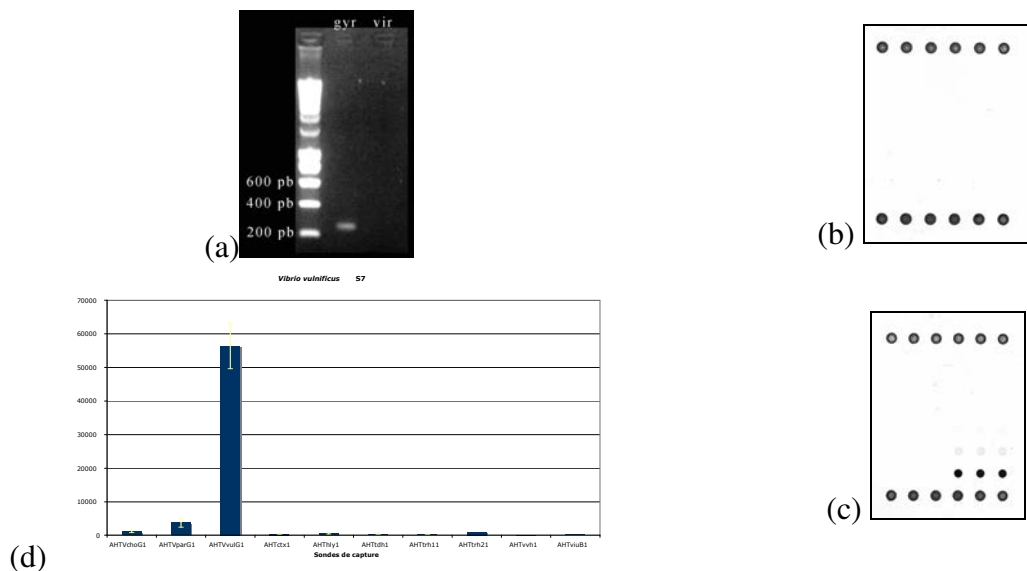


Figure 15 - Résultats d'hybridation pour l'espèce *V. vulnificus* (souche S7).

- Électrophorèse sur gel d'agarose 1% des amplicons obtenus par PCR biotinylée sur l'ADN génomique de *V. vulnificus* (souche S7)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant du blanc PCR effectué lors de la PCR sur l'ADN génomique de *V. vulnificus* (souche S7)
- Détection colorimétrique après hybridation des amplicons résultant des deux PCR gyrase et virulence effectuées sur l'ADN génomique de *V. vulnificus* (souche S7)
- Représentation graphique de l'intensité des signaux obtenus après hybridation pour chacune des sondes spécifiques.

Souches	Espèce	Détection espèce		Détection virulence		PCR Hybridation		Hybridation	
		PCR	Séquençage	PCR	Séquençage	Gyrase	Virulence	Gyrase	Hybridations non spécifiques
S1	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA-/hlyA+	hlyA+	ok		ok	/
S5	<i>v. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S14	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S15	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S16	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S17	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S18	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA-/hlyA+	hlyA+	ok	ctxA faible	ok	AHTVparG1
S19	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S19bis	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S20	<i>V. cholerae</i>	ok	ok	ctxA+/hlyA+	ctxA+/hlyA+	ok	ctxA+	ok	AHTVparG1
S4	<i>V. vulnificus</i>	ok	ok	vvhA+/viuB+	vvhA+/viuB+	ok	vvhA+	ok	
S6	<i>V. vulnificus</i>	ok	ok	vvhA+/viuB+	vvhA+/viuB+	ok	vvhA+	ok	
S7	<i>V. vulnificus</i>	ok	ok	vvhA-/viuB-	/	ok	/	ok	AHTVchoG1 - AHTVparG1
S2	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	tdh+/trh+	trh1+	ok	tdh+	ok	AHTVchoG1
S3	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	tdh-/trh-	/	non	/	non	
S10	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	tdh-/trh+	trh2+	ok	/	ok	AHTVchoG1
S22	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	tdh-/trh-	/	ok	/	ok	AHTVchoG1
S23	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	tdh-/trh+	trh2+	ok	/	ok	AHTVchoG1
S24	<i>V. parahaemolyticus</i>	ok	ok	tdh+/trh+	tdh+/trh1+	ok	tdh+	ok	AHTVchoG1

Tableau 8 - Récapitulatif des différents résultats obtenus lors des PCR non biotinylées de détection (gyrase) et de virulence, lors des PCR biotinylées consensus "gyrase" et multiplexe "virulence" et lors des tests d'hybridation spécifique

2.3.1.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Lors des PCR non biotinylées, une amplification avait pu être observée pour toutes les souches de *V. parahaemolyticus* pour le marqueur gyrase. Lors des tests PCR de virulence, les souches S2 et S24 avaient été caractérisées *tdh*+/*trh*1+ et les souches S10 et S23, *tdh*-/*trh*2. Enfin, aucune amplification n'avait pu être obtenue pour les souches S3 et S22. Comme pour *V. cholerae*, un dixième des produits d'amplification de la PCR biotinylée ont été prélevés et déposés sur gel d'agarose 1% dans le but de vérifier l'efficacité de l'amplification (résultats non montrés).

La figure 12 montre les résultats obtenus lors de l'hybridation de la souche S2, comparables à ceux observés pour la souche S24. Les séquences cibles ont bien été amplifiées pour chacun des gènes cibles (fig. 12a). On observe, sur la photo de détection colorimétrique, la présence de signaux pour les contrôles positifs d'hybridation et de détection ainsi que l'absence de ces signaux pour le contrôle négatif d'hybridation. Comme attendu, un signal est détecté pour les sondes *gyrA*, *tdh* et *trh*1. Par contre, un signal plus faible est détecté pour deux sondes spécifiques à *V. cholerae* (*VchoG1* et *hlyA*). L'absence de signaux lors de l'hybridation du blanc PCR pour ces deux souches indique qu'il n'y a pas eu de contamination au niveau des solutions PCR (fig. 12b).

La souche S22 de *V. parahaemolyticus* (*tdh*-/*trh*-) présente bien une réponse négative pour les gènes de virulence lors de l'amplification, ce qui est confirmé par hybridation (fig. 13a et 13c). En plus des contrôles positifs, un signal spécifique est détecté pour la sonde correspondant à la gyrase (*VparG1*) mais également un faible signal pour le marqueur gyrase de l'espèce *V. cholerae*.

Comme signalé précédemment pour les souches S2 et S24, la biochip est capable de différencier les deux variants du gène *trh*, nommés *trh*1 et *trh*2. En effet, pour les 2 souches S2 et S24, seul le signal *trh*1 a été détecté (fig. 12c). Par contre pour les souches S10 et S23, c'est la sonde correspondant à *trh*1 qui s'allume spécifiquement (résultats non montrés).

2.3.1.3 *Vibrio vulnificus*

Pour rappel, lors des PCR non biotinylées, les trois souches testées avaient montré une amplification pour le marqueur gyrase, tandis que seules les souches S4 et S6 avaient été caractérisées *vvhA*+/*viuB*+. Lors de l'hybridation, la détection colorimétrique a permis de vérifier, grâce aux contrôles, l'absence de problèmes au niveau de la détection ou de l'hybridation. Comme le montre la figure 14, des signaux spécifiques ont été observés pour les marqueurs *gyrA*, *vvhA* et *viuB* pour la souche S4. Des résultats similaires ont été obtenus pour la souche S6. La souche S7, quant à elle, présente bien une réponse négative pour les gènes de virulence lors de l'amplification, ce qui est confirmé par hybridation (fig. 15a et 15c). Un signal est détecté pour la sonde correspondant à la gyrase (*VvulG1*), mais également pour le marqueur gyrase de *Vibrio parahaemolyticus* (figure 15d). Encore une fois, l'intensité des signaux obtenus pour cette hybridation non spécifique est faible. Aucune contamination n'a pu être observée lors de l'hybridation du blanc PCR de *V. vulnificus* S7, éliminant l'hypothèse d'une contamination au niveau de l'amplification. On vérifie encore une fois une bonne correspondance entre les résultats obtenus par PCR et les résultats d'hybridation.

Un récapitulatif des résultats obtenus pour les PCR non biotinylées, les PCR biotinylées et les hybridations des 19 souches testées est présenté dans le tableau 8.

2.3.2 Essais préliminaires d'hybridation d'espèces non ciblées de la famille des *Vibrionacées*.

Afin de vérifier la spécificité des sondes vis à vis d'autres espèces proches non ciblées, cinq membres de la famille des *Vibrionacées* ont été testés. Il s'agit de *P. angustum*, *V. campbelli*, *V. mimicus*, *V. alginolyticus* et *V. metschnikovii*. Les PCR biotinylées consensus et multiplexes ont été effectuées sur ces 5 ADN génomiques et une fraction de celles-ci a été déposée sur gel. Comme attendu, l'amplification de la séquence cible *gyrA* a été obtenue pour les 5 espèces étant donné l'utilisation d'amorces consensus (figure 16a). Par contre, la PCR de virulence, puisqu'elle utilise des amorces spécifiques, ne devait donner aucune amplification. Toutefois, une bande spécifique est quand même observée pour deux espèces, un fragment de taille de 300 pb pour *V. campbelli*, ordre de taille attendue pour la plupart des séquences cibles de virulence, et un fragment de taille plus importante (450 pb) pour *V. mimicus*.

Au niveau de l'hybridation, mis à part les contrôles de détection et d'hybridation, aucun signal n'a pu être détecté pour *P. angustum*, *V. campbelli* et *V. alginolyticus*, malgré les amplifications observées pour les deux PCR vis à vis de cette dernière. En revanche, les deux espèces restantes présentent de faibles hybridations croisées. *V. mimicus*, pour sa part, cross réagit avec la sonde VchoG1 de *V. cholerae* et plus faiblement avec les sondes *vvhA* et *ViuB* de *V. vulnificus* (fig. 16b). La comparaison des séquences cibles entre *V. cholerae* et *V. mimicus* montre que la sonde VchoG1 présente trois substitutions par rapport à la séquence du marqueur *gyrA* de *V. mimicus*, nombre normalement suffisant pour permettre une différenciation totale entre les deux *Vibrio* (fig. 17). Les hybridations croisées avec les sondes *vvhA* et *viuB*, quant à elles, ne semblent pas s'expliquer par un manque de spécificité des sondes étant donné le nombre de substitution plus grand que 3 entre celles-ci et les séquences qui cross hybrident.

V. metschnikovii présente quant à lui un signal faible pour les sondes VchoG1 et *hlyA* de *V. cholerae*. A nouveau, ces hybridations croisées ne peuvent s'expliquer par un manque de spécificité des sondes vis à vis de la séquence cible, le nombre de substitutions étant supérieur à 3 (6 substitutions sur une séquence de 25 bases) (fig. 17).

VcholeraeS19	1	GCGGCAATG CGTTATACCG AAGTTCTGAT GTC	GAAAATC GCGCACGAAC TCTTG
Vmetschnikovii	1	TGCGGCAATG CGTTACACCG AAGTTCTGAAT GGCA	AAAAATG GCCCATGAAC TATTG
Vmimicus	1CAATG CGTAA.ACCA ACGTTC.CAT GTCGAATATC	GCGCACGAGC TCTTG
VcholeraeS19	56	GCAGA CCTAGACAAA GAAACCGTTG ACTACGTTCC	GAACATGAC GGCACCGAGC
Vmetschnikovii	56	GCTGA CCTAGACAAA GAGACCGTAG ACTACGTACC	AACTACGAC GGTACTGAGC
Vmimicus	49	GTAGA CCTAGATAAA GAAGCCGTTG ACTACGTTCC	GAACATGAC GGCACCGAGC
VcholeraeS19	111	AGATCCCTGC GGTATTGCCG ACAAAGATCC CGAACCTGCT	GATCAACGG.
Vmetschnikovii	111	AGATCCCAGC GGTTCCTCCA ACTAAAATTC CAAACCTATT	GGTTAACGGT GCTT
Vmimicus	103	AGATCCCTGC GGTATTGCCG ACGAAGATTC CGAACCTGCT	GATCAACGGT GCAT
VcholeraeS19		
Vmetschnikovii	165	CTGGTA TCGCAGTAGG TATGGCAACC AACATTCCAC	
Vmimicus	157	CCGGTA TAGCAGTGGG TATGGCAGCA C.....	

Figure 17 – Alignement des trois espèces de *Vibrio* pour lesquelles des hybridations croisées ont été observées au niveau du marqueur gyrase.

En jaune : séquence de la sonde de capture du marqueur gyrase spécifique de *V. cholerae* (VchoG1).

En gris : substitutions entre les séquences gyrase de *V. metschnikovii* et *V. mimicus* et la sonde VchoG1.

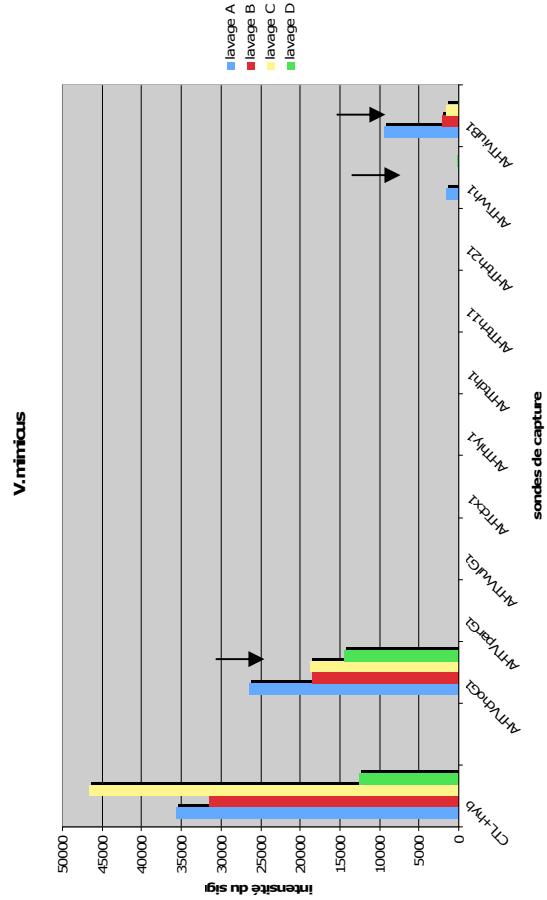
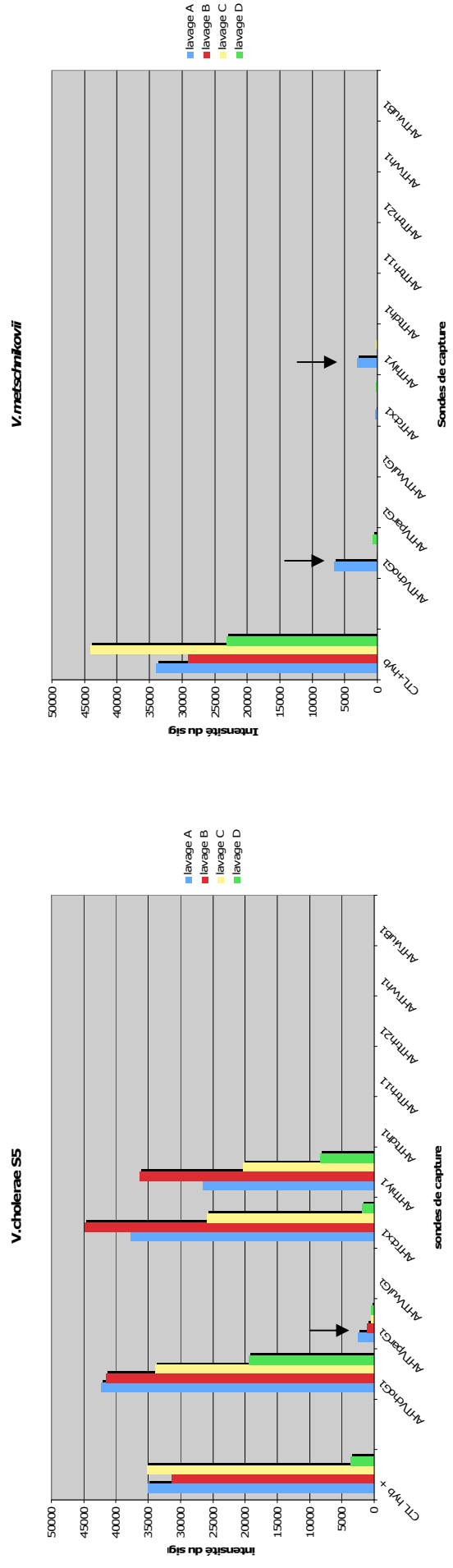


Figure 18 - Comparaison de l'effet de la stringence des 4 lavages sur les hybridations non-spécifiques. Ces lavages ont été testés sur trois espèces présentant des hybridations croisées (*V.cholerae* S5, *V.mimicus* et *V. metschnikovii*).

2.4 Etude de l'effet de la stringence de différents lavages post-hybridation.

L'intérêt de l'outil développé étant de permettre une identification spécifique des espèces ciblées, il est donc nécessaire de tenter d'éliminer les signaux aspécifiques observés lors des hybridations des espèces d'intérêt et des espèces proches. Pour cela, une possibilité est d'augmenter la stringence de la méthode, influencée par deux paramètres principaux : la température d'hybridation d'une part et la concentration en sels des différents lavages d'autre part. Une augmentation de la température améliore généralement la spécificité de l'appariement, mais en ce qui nous concerne, la température de 65°C utilisée lors des expérimentations est déjà fort élevée vis à vis des T_m des sondes sélectionnées. Une température plus élevée risquerait de décrocher les sondes spécifiques. En revanche, une augmentation de la stringence des lavages peut quant à elle être testée sur notre modèle. Comme dit dans l'introduction, une concentration plus importante en sels favorise la formation des hybrides en annulant les charges phosphates négatives de l'ADN. La force de répulsion entre les deux brins est donc fortement diminuée, ce qui facilite l'appariement. Une diminution de cette concentration devrait donc permettre de déstabiliser les hybridations non spécifiques.

Pour cela, différents lavages de stringence variable ont été testés sur 3 espèces présentant des hybridations croisées : la souche S5 de *V.cholerae*, *V. mimicus* et *V. metschnikovii*. Les différentes hybridations ont été réalisées au départ d'une même PCR, que ce soit pour le marqueur gyrase ou pour les marqueurs de virulence, pour chaque espèce. La composition des lavages testés est résumée au tableau 9. Le lavage A correspond au lavage utilisé pour les tests de spécificité présentés ci-dessus.

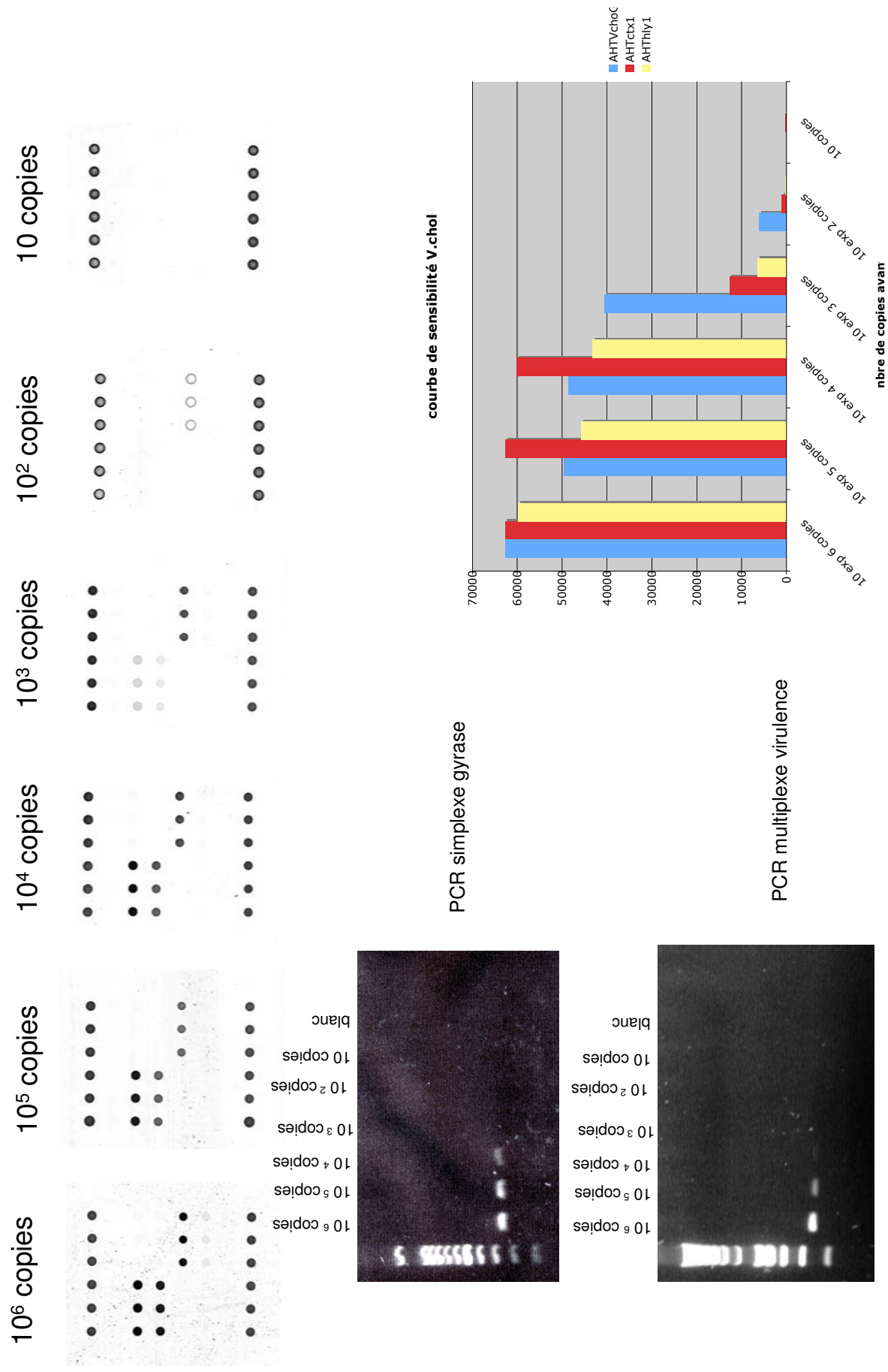
	Après hybridation	Après anticorps
Lavage A	3X unibuffer 0,1X tween 0,1% 2X unibuffer 0,02	4X unibuffer 0,1X tween 0,1%
Lavage B	2X unibuffer 0,1X tween 0,1% 2X unibuffer 0,004	2X unibuffer 0,1X tween 0,1% 2X unibuffer 0,0025X
Lavage C	2X unibuffer 0,05X tween 0,1% 2X unibuffer 0,004	2X unibuffer 0,05X tween 0,1% 2X unibuffer 0,0025X
Lavage D	2X unibuffer 0,01X tween 0,1% 2X unibuffer 0,004	2X unibuffer 0,1X tween 0,1% 2X unibuffer 0,0025X

Tableau 9 - Différentes conditions de lavage testées afin d'éliminer les hybridations croisées. Les lavages sont classés selon leur degré de stringence de plus en plus élevé .

La comparaison entre les effets des différents lavages est présentée à la figure 18. Sur chaque graphique sont repris pour chacun des cas, en plus des sondes ayant cross réagit, les résultats obtenus pour le contrôle d'hybridation, utilisé ici comme contrôle positif, ainsi que ceux pour les sondes spécifiques dans le cas de *V.cholerae* S5 (fig. 18a)

On peut remarquer que pour la souche *V.metschnikovii* (fig. 18b), les hybridations croisées observées lors du lavage standard (lavage A) sont rapidement éliminées dès le deuxième lavage testé (lavage B).

Figure 19 - Courbe de sensibilité de *V.cholerae* S5:



En ce qui concerne *V.cholerae* S5 (fig. 18a), le lavage C arrive à éliminer les hybridations croisées sur la sonde VparG1 sans pour autant diminuer l'intensité de réponse des sondes spécifiques et le contrôle d'hybridation. Par contre le lavage D semble beaucoup trop stringent et engendre une chute des réponses spécifiques pour chacune des espèces testées.

Le cas de *V.mimicus* reste préoccupant. Comme le montre la figure 18c, aucun des lavages testés ne réussit à éliminer l'hybridation aspécifique observée au niveau de la sonde V.choG1, pas même le lavage D. Ce résultat est des plus étonnants vu que la sonde présente malgré tout deux substitutions vis-à-vis de la séquence gyrase de *V.mimicus* qui complémente. Le lavage D aurait dû, en théorie, décrocher la cible aspécifique.

Il ressort donc que le lavage C semble le mieux adapté pour favoriser une hybridation spécifique des gènes cibles.

2.5 Test de sensibilité de la biochips pour les trois espèces *Vibrio*.

La dernière étape de validation consiste à déterminer la concentration minimale en ADN pouvant être détectée, d'une part lors de la PCR, et d'autre part lors de l'hybridation. Pour chacune des espèces d'intérêt, le nombre de copies correspondant à 5 ng d'ADN (quantité utilisée lors de la PCR) a été estimé à un million de copies. Les échantillons d'ADN ont ensuite été dilués de 10 en 10 pour atteindre 10 copies d'ADN présentes dans l'échantillon avant PCR. Après la réalisation des PCR consensus et multiplexe biotinylées, ces différentes dilutions ont été déposées sur gel d'agarose 1% et hybridées. Les conditions restent identiques à celles décrites au point 1.3 du matériel et méthodes. On s'attend classiquement à obtenir une sensibilité 10 à 100 fois supérieure lors de l'hybridation par rapport à la PCR.

2.5.1 *V. cholerae*

L'électrophorèse sur gel d'agarose présentée à la figure 19 montre que l'on parvient à détecter jusqu'à 10 000 copies lors des PCR consensus "gyrase" et multiplexe "virulence". L'hybridation est beaucoup plus sensible puisqu'elle a permis la détection de 100 copies du gène *gyrA* et de 1000 copies des gènes *hlyA* et *ctxA*. On voit donc que les sondes de détection spécifiques montrent une bonne sensibilité en comparaison à la PCR, puisqu'elles permettent de détecter des concentrations de 10 à 100 fois plus faibles.

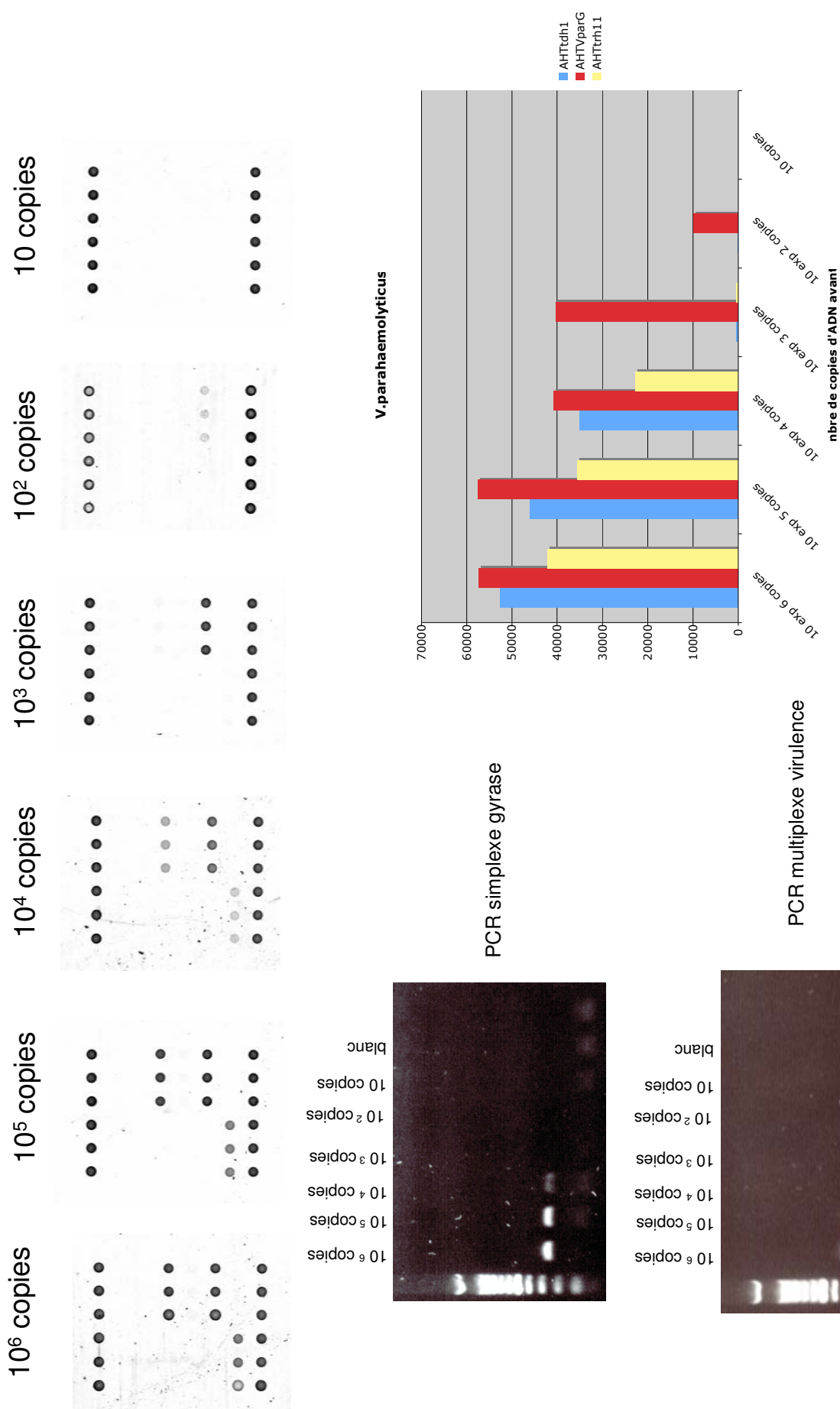
2.5.2 *V. parahaemolyticus*

La figure 20 montre que la PCR consensus "gyrase" permet une détection de 10 000 copies, tandis que la PCR multiplexe "virulence" montre une amplification jusqu'à 100 000 copies. Les résultats d'hybridation indiquent que l'on détecte jusqu'à 100 copies du gène *gyrA* et 10 000 copies des gènes de virulence *tdh* et *trh1*. A nouveau, la détection par hybridation montre une sensibilité 10 à 100 fois supérieure à celle obtenue en PCR.

2.5.3 *V. vulnificus*

La sensibilité de détection de l'espèce *V. vulnificus* est plus faible que celles obtenues pour les deux autres espèces, comme le montre la figure 21. En effet, la limite de détection des gènes *gyrA* et de virulence lors des PCR consensus "gyrase" et multiplexe "virulence" est de 100 000 copies. L'hybridation permet quant à elle la détection de 1000 copies pour les

Figure 20 - Courbe de sensibilité de *V.parahaemolyticus* S2



gènes *gyrA* et *viuB*, et de 10 000 copies pour le gène *vvhA*. L'hybridation est donc encore une fois 10 à 100 fois plus sensible que la PCR.

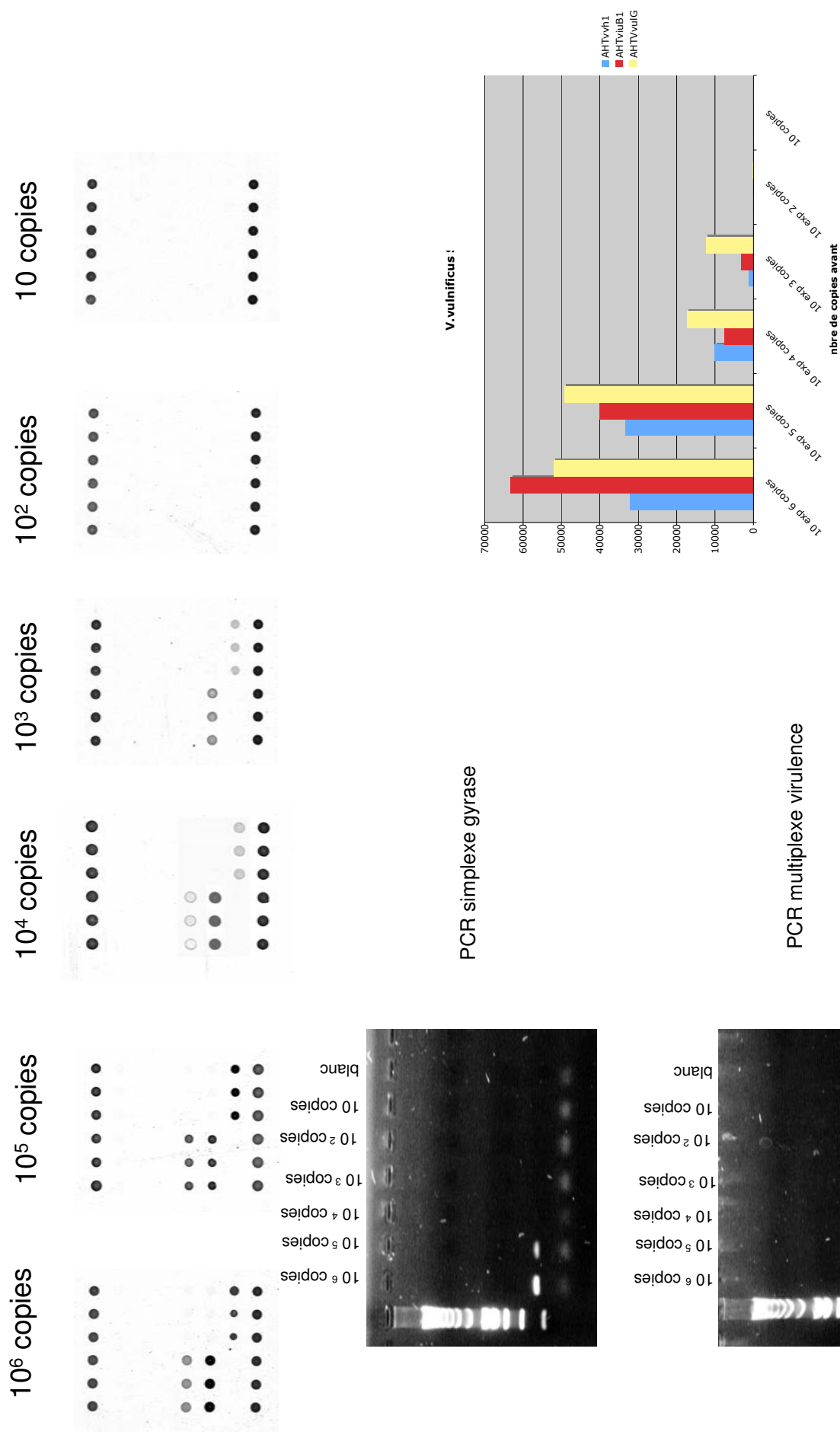
En conclusion, la limite de détection sur gel de la PCR simplexe « gyrase » varie de 100 000 copies avant PCR pour *V.vulnificus* à 10 000 copies avant PCR pour *V.cholerae* et *V.parahaemolyticus*, ce qui reste encore une détection faible pour une PCR simplexe. Toutefois, grâce à la meilleure sensibilité de l'hybridation, il est possible de détecter jusqu'à 1000 copies chez *V.vulnificus* et 100 copies avant PCR chez *V.cholerae* et *V.parahaemolyticus*.

Quant à la PCR de virulence, la sensibilité en hybridation varie de 10 000 à 1000 copies détectées en fonction des gènes cibles mais reste en général également assez faible. Cette baisse d'efficacité peut s'expliquer par le fait qu'il s'agit d'une PCR multiplexe. En effet, la présence de plusieurs paires d'amorces dans le mélange PCR réduit la sensibilité de l'amplification.

Un autre point préoccupant est cette chute brutale de la réponse spécifique pour certaines sondes, que l'on peut notamment observer chez *V.parahaemolyticus* pour les marqueurs *tdh* et *trh1* au passage de 10 000 à 1000 copies, ainsi que chez *V.cholerae* pour les marqueurs *ctxA* et *hlyA* entre 1000 copies et 100 copies, signe d'un manque de robustesse de la PCR.

Il semble donc qu'une nouvelle optimisation des conditions PCR soit nécessaire afin d'en augmenter la robustesse et d'ainsi améliorer la sensibilité de la détection sur biochips.

Figure 21 - Courbe de sensibilité de *V. vulnificus* S4



Conclusions et perspectives

La présence des *Vibrio* dans les fruits de mer peut avoir des répercussions importantes, tant sur un plan médical qu'économique. L'industrie alimentaire des fruits de mer a donc tout intérêt à disposer d'un outil performant permettant de déceler la présence de bactéries pathogènes dans les aliments commercialisés, et en particulier les *Vibrio*, ceux-ci représentant 20% des infections alimentaires liées aux fruits de mer. Parmi ces *Vibrio*, il en est trois qui sont plus fréquemment impliqués dans ces infections alimentaires : *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* et *V.vulnificus*.

Différentes techniques permettent de détecter les *Vibrio* dans les échantillons alimentaires. Parmi celles-ci, la technique de la PCR est sans doute la technologie la plus utilisée, que ce soit pour les *Vibrio* ou pour d'autres pathogènes. Différentes études ont montré que l'identification de souches potentiellement pathogènes nécessite la détection de plusieurs gènes cibles par amplification. Ceci implique autant de tests PCR qu'il n'y a de gènes cibles, ce qui représente un travail considérable.

Nous avons donc tenté de développer une biochips permettant la détection des trois espèces de *Vibrio* d'intérêt, leur identification ainsi que la détection des caractères de virulence, tout cela en un seul test. Le développement d'un tel test pourrait engendrer un gain de temps considérable, permettant d'une part de protéger la santé des consommateurs en réduisant le nombre d'infections et d'autre part un gain d'argent non négligeable.

Pour cela, nous avons mis au point deux PCR, l'une permettant l'amplification du marqueur gyrase, destiné à détecter et identifier les pathogènes éventuellement présents dans l'échantillon, l'autre permettant la détection de marqueurs de virulence. Dans le cadre de ce mémoire, les gènes de virulence sélectionnés sont au nombre de deux par espèce, *ctxA* et *hlyA* pour *V.cholerae*, *tdh* et *trh* pour *V.parahaemolyticus* et *vvhA* et *viuB* pour *V.vulnificus*, tous ces gènes étant amplifiés en une même PCR, dite multiplexe. Les amplicons produits et marqués lors de ces PCR ont ensuite été hybridés sur le damier à ADN élaboré pour cette étude afin de tester son efficacité.

Les résultats obtenus lors de l'amplification semblent être confirmés en hybridation. En effet, pour chacune des souches testées, nous avons pu détecter un signal pour la sonde gyrase correspondant à l'espèce à identifier ainsi que pour les marqueurs de virulence lorsqu'il y avait lieu de les détecter. Nous avons cependant rencontré des problèmes d'hybridation croisée pour certaines souches. En particulier, lors de l'hybridation de *V.cholerae*, nous avons remarqué que la sonde de capture VparG1 s'allumait pour chacune des souches testées. Parallèlement, le marqueur gyrase spécifique de *V.cholerae* (VchoG1) a également été détecté lors de l'hybridation des différentes souches de *V.parahaemolyticus*. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces hybridations aspécifiques. Il faut tout d'abord souligner que ces hybridations croisées sont très faibles. En effet, nous hybridons sur les chips des quantités énormes d'amplicons qui donnent de très grosses bandes de détection en gel d'agarose. Or, nous avons montré dans les tests de sensibilité que les détections sur chips sont 10 à 100 fois plus sensibles que sur gel. La réaction croisée est donc peu significative comparée à la réaction spécifique. Au niveau des raisons possibles, on peut envisager une hybridation croisée entre espèces, mais ceci hypothèse est peu probable étant donné le nombre élevé de substitutions entre les séquences spécifiques des différentes espèces. En effet, le tableau suivant montre 8 substitutions entre la sonde VparG1 et la séquence spécifique de *V.cholerae*, et 5 substitutions entre la sonde VchoG1 et la séquence spécifique de *V.parahaemolyticus*. La seule hybridation croisée possible serait entre la séquence cible de *V.vulnificus* et la sonde spécifique à *V.parahaemolyticus* (VparG1) puisqu'elles ne diffèrent que par 3 bases sur les 25

constituant la sonde (tableau 1). Or, lors des hybridations des 3 souches de *V.vulnificus*, cette sonde ne s'est allumée dans aucun des cas (réf à la fig dans résultats.)

	<i>V.cholerae</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>
VchoG1	0	5	4
VparG1	8	0	3
VvulG1	4	5	0

Tableau 1 - Nombre de substitutions entre les séquences des sondes sélectionnées et les séquences spécifiques de chaque espèce pour le marqueur gyrase.

Il est également possible que les échantillons d'ADN génomique aient été contaminés, soit lors de l'étape d'extraction, soit lors de l'étape d'amplification. Un indice étayant cette supposition est que lorsqu'on observe des hybridations aspécifiques pour une souche, il s'agit souvent de marqueurs spécifiques d'une même espèce. L'absence de signaux lors de l'hybridation des blancs PCR laisse penser qu'il n'y a pas eu de contamination au niveau des PCR par d'autres amplicons provenant d'amplifications précédentes. Le laboratoire qui nous a fourni les échantillons nous a confirmé que cette contamination est possible

Une autre hypothèse concernerait une éventuelle contamination lors de la synthèse des sondes de capture. Les hybridations pourraient être reproduites sur un nouveau lot de sondes de capture afin de vérifier cette éventualité.

Enfin, l'hybridation d'un fragment aspécifique amplifié lors des réactions PCR pourrait également expliquer ces hybridations croisées. En effet, des bandes aspécifiques d'intensité plus faible ont été observées lors de la mise au point de la PCR multiplexe. Afin de répondre à cette question, il suffirait simplement d'hybrider la bande d'intérêt purifiée après la PCR biotinylée. Dans le cas où les hybridations croisées auraient disparu, une nouvelle mise au point des conditions PCR serait nécessaire afin d'augmenter la spécificité de l'amplification.

De même, lors des tests préliminaires de spécificité effectués à partir de souches de la famille des *Vibrionacées*, nous avons observé une amplification non spécifique lors de la PCR de virulence pour les deux espèces *V.campbelli* et *V.mimicus*. L'amplicon obtenu pour la souche de *V.campbelli* était d'une longueur correspondant à la longueur attendue pour les différents gènes de virulence, c'est-à-dire environ 300 pb. Il pourrait donc s'agir de l'amplification d'un des gènes de virulence ou d'un gène dont la séquence est proche de celle d'un des marqueurs de virulence. Toutefois, l'hybridation de cette souche n'a donné aucun résultat, ce qui laisse à penser d'une part que l'amplification ne soit pas due à une contamination de l'échantillon et que, d'autre part, malgré l'amplification, le pourcentage d'identité de cette séquence ne soit pas suffisant pour s'hybrider sur une des sondes. Dans le cas de *V.mimicus*, un signal a été détecté pour les marqueurs *vvhA* et *viuB* ainsi que pour le marqueur gyrase spécifique de *V.cholerae*. L'hybridation aspécifique observée pour le marqueur gyrase pourrait s'expliquer par le fait que 3 substitutions distinguent les séquences des marqueurs gyrase de *V.mimicus* et *V.cholerae* bien qu'en théorie, ce nombre soit normalement suffisant pour permettre une différenciation totale entre les deux *Vibrio*. Les hybridations croisées avec les sondes *vvhA* et *viuB*, quant à elles, ne semblent pas s'expliquer par un manque de spécificité des sondes étant donné le nombre de substitution supérieur à

trois entre celles-ci et les séquences qui cross hybrident. Il pourrait s'agir soit d'une contamination au niveau des échantillons, étant donné qu'il s'agit des marqueurs de la même espèce, soit d'une amplification d'une séquence aspécifique présentant une affinité suffisante pour cross réagir faiblement, comme expliqué précédemment. Enfin, nous avons également observé une faible hybridation aspécifique pour l'espèce *V.metschnikovii* au niveau des sondes hlyA et VchoG1. A nouveau, l'hypothèse d'une contamination semble vraisemblable, étant donné qu'il s'agit de deux marqueurs de *V. cholerae*.

Afin d'éliminer ces hybridations aspécifiques, différents lavages ont été testés. Un de ceux-ci a permis d'éliminer ces hybridations croisées, tout en conservant les signaux spécifiques. Cependant, l'hybridation au niveau du marqueur gyrase de *V.cholerae* pour la souche de *V.mimicus* n'a pas pu être éliminée malgré la stringence des lavages de plus en plus importante, résultat étonnant puisqu'un des lavages testés (lavage D) diminuait fortement l'intensité du contrôle d'hybridation. Ce lavage aurait donc du décrocher les ADN liés à la sonde VchoG1. Ici également les résultats vont dans le sens d'une contamination de l'ADN génomique. Cette hypothèse pourrait être facilement vérifiée par le séquençage de l'amplicon obtenu lors de la PCR. Si l'ADN est contaminé, la séquence ainsi obtenue devrait présenter un profil de contamination, c'est-à-dire une succession de pics se chevauchant.

Afin de contourner cette difficulté, une possibilité serait d'ajouter une seconde sonde pour la détection de *V.cholerae*. Dans ce cas, la détection serait considérée comme positive si les deux sondes sont allumées.

La dernière étape dans la mise au point de la biochips a consisté à déterminer la sensibilité des deux techniques utilisées, à savoir la PCR et l'hybridation. La différence de sensibilité observée entre ces deux méthodes, d'un facteur 10 à 100 en faveur de l'hybridation, correspond à ce qui est généralement attendu. La biochips développée semble donc suffisamment puissante. Cependant, la limite de détection observée sur gel pour les amplifications reste faible. De plus, la chute brutale constatée au niveau des intensités des signaux de détection témoigne du manque de puissance au niveau de la PCR. Il serait intéressant de tenter d'améliorer les conditions d'amplification afin de renforcer la PCR et d'augmenter la sensibilité de détection.

Toutes ces expériences ont été réalisées sur des échantillons d'ADN génomique des différentes espèces. Pour rappel, nous avons testé 10 souches de *V.cholerae*, 6 souches de *V.parahaemolyticus* et 3 souches de *V.vulnificus*. Pour ce qui est des espèces de la famille des *Vibrionacées*, nous disposons de 5 souches. Il serait intéressant d'élargir le nombre de souches testées, en particulier pour *V.vulnificus* et pour les espèces proches, afin de confirmer les résultats obtenus.

Tout aussi intéressant serait de tester la biochips sur des échantillons "réels", c'est-à-dire sur des échantillons alimentaires potentiellement contaminés. Ceci permettrait de vérifier la spécificité du damier en s'assurant qu'aucune hybridation aspécifique ne survienne avec l'ADN d'autres espèces éventuellement présentes dans les échantillons. En effet, le nombre d'espèces bactériennes présentes dans les fruits de mer est considérable, de par leur rôle bien connu de filtreurs, et il est impossible de toutes les tester spécifiquement. Vu la diversité importante de ces bactéries, il existe toujours un risque qu'une hybridation aspécifique survienne. Afin d'éviter des faux positifs, il serait opportun d'ajouter une sonde de détection pour chaque espèce, en considérant la détection comme positive si une hybridation est observée pour les 2 sondes.

En conclusion, malgré les faibles hybridations croisées observées, il semble donc que la biochips mise au point dans le cadre de ce mémoire soit efficace, puisqu'elle a permis la détection, l'identification ainsi que la caractérisation de toutes les souches testées lors de ce travail. Néanmoins, il est possible d'améliorer cette technique en la rendant plus sensible et plus spécifique.

Bibliographie

- Alexandre, I., S. Hamels, et al. (2001). "Colorimetric silver detection of DNA microarrays." Anal Biochem **295**(1): 1-8.
- Baron, S. (1996). Medical microbiology. Galveston, Tex., University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Bej, A. K., D. P. Patterson, et al. (1999). "Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*." J Microbiol Methods **36**(3): 215-25.
- Bergey, D. H., N. R. Krieg, et al. (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Bullen, J. J., P. B. Spalding, et al. (1991). "Hemochromatosis, iron and septicemia caused by *Vibrio vulnificus*." Arch Intern Med **151**(8): 1606-9.
- Butt, A. A., K. E. Aldridge, et al. (2004 (1)). "Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections." Lancet Infect Dis **4**(4): 201-12.
- Butt, A. A., K. E. Aldridge, et al. (2004 (2)). "Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety." Lancet Infect Dis **4**(5): 294-300.
- Byun, R., L. D. Elbourne, et al. (1999). "Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes." Infect Immun **67**(3): 1116-24.
- Chattopadhyay, K., D. Bhattacharyya, et al. (2002). "Vibrio cholerae hemolysin. Implication of amphiphilicity and lipid-induced conformational change for its pore-forming activity." Eur J Biochem **269**(17): 4351-8.
- Chiang, S. R. and Y. C. Chuang (2003). "Vibrio vulnificus infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy." J Microbiol Immunol Infect **36**(2): 81-8.
- Coelho, A., J. R. Andrade, et al. (2000). "Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin." Infect Immun **68**(3): 1700-5.
- Cronin, M. T., R. V. Fucini, et al. (1996). "Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays." Hum Mutat **7**(3): 244-55.
- Davis, C. R., L. C. Heller, et al. (2004). "Real-time PCR detection of the thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes in a *Vibrio parahaemolyticus* cultured from mussels and mussel homogenate associated with a foodborne outbreak." J Food Prot **67**(5): 1005-8.
- DePaola, A., J. L. Nordstrom, et al. (2003). "Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters." Appl Environ Microbiol **69**(3): 1521-6.
- Drlica, K. and X. Zhao (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." Microbiol Mol Biol Rev **61**(3): 377-92.
- Duguet, M. (1997). "When helicase and topoisomerase meet!" J Cell Sci **110 (Pt 12)**: 1345-50.
- Favis, R. and F. Barany (2000). "Mutation detection in K-ras, BRCA1, BRCA2, and p53 using PCR/LDR and a universal DNA microarray." Ann N Y Acad Sci **906**: 39-43.
- Favis, R., J. P. Day, et al. (2000 (2)). "Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2." Nat Biotechnol **18**(5): 561-4.
- Foultier, B., L. Moreno-Hagelsieb, et al. (2005). "Comparison of DNA detection methods using nanoparticles and silver enhancement." IEE Proc Nanobiotechnol **152**(1): 3-12.
- Godefroid, E. (2000). "Les puces à ADN." Chimie Nouvelle **18**(70): 3113-20.
- Gray, L. D. and A. S. Kreger (1987). "Mouse skin damage caused by cytolysin from *Vibrio vulnificus* and by *V. vulnificus* infection." J Infect Dis **155**(2): 236-41.
- Gubala, A. J. (2006). "Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*." J Microbiol Methods **65**(2): 278-93.

- Gulig, P. A., K. L. Bourdage, et al. (2005). "Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*." J Microbiol **43 Spec No**: 118-31.
- Hamels, S., J. L. Gala, et al. (2001). "Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance." Biotechniques **31**(6): 1364-6, 1368, 1370-2.
- Honda, T. and T. Iida (1993). "The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysin." Reviews in medical microbiology **4**: 106-113.
- Honda, T., C. Sornchai, et al. (1982). "Immunological detection of the Kanagawa phenomenon of *vibrio parahaemolyticus* on modified selective media." J Clin Microbiol **16**(4): 734-6.
- Hoshino, K., S. Yamasaki, et al. (1998). "Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139." FEMS Immunol Med Microbiol **20**(3): 201-7.
- Huang, W. M. (1996). "Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes." Annu Rev Genet **30**: 79-107.
- Iwasaki, H., Y. Ezura, et al. (2002). "Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides." DNA Res **9**(2): 59-62.
- Johnson, D. E. and F. M. Calia (1981). "Hemolytic reaction of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*." J Clin Microbiol **14**(4): 457-9.
- Kelly, M. T. and E. M. Stroh (1989). "Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest." J Clin Microbiol **27**(12): 2820-2.
- Kishishita, M., N. Matsuoka, et al. (1992). "Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (trh) gene of *Vibrio parahaemolyticus*." Appl Environ Microbiol **58**(8): 2449-57.
- Kook, H., S. E. Lee, et al. (1996). "*Vibrio vulnificus* hemolysin dilates rat thoracic aorta by activating guanylate cyclase." Life Sci **59**(3): PL41-7.
- Kreger, A. and D. Lockwood (1981). "Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*." Infect Immun **33**(2): 583-90.
- Lencer, W. I. (2001). "Microbes and microbial Toxins: paradigms for microbial-mucosal toxins. V. Cholera: invasion of the intestinal epithelial barrier by a stably folded protein toxin." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(5): G781-6.
- Lipp, E. K., I. N. Rivera, et al. (2003). "Direct detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian coastal water and plankton by PCR." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3676-80.
- Lipshutz, R. J., S. P. Fodor, et al. (1999). "High density synthetic oligonucleotide arrays." Nat Genet **21**(1 Suppl): 20-4.
- Myers, M. L., G. Panicker, et al. (2003). "PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico." Appl Environ Microbiol **69**(4): 2194-200.
- Nishibuchi, M., M. Ishibashi, et al. (1985). "Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *vibrio* species by the DNA colony hybridization test." Infect Immun **49**(3): 481-6.
- Oliver, J. D. (1995). "The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*." FEMS Microbiol Lett **133**(3): 203-8.

- Panicker, G. and A. K. Bej (2005). "Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*." Appl Environ Microbiol **71**(10): 5702-9.
- Panicker, G., D. R. Call, et al. (2004). "Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays." Appl Environ Microbiol **70**(12): 7436-44.
- Panicker, G., M. L. Myers, et al. (2004). "Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR." Appl Environ Microbiol **70**(1): 498-507.
- Parvathi, A., H. S. Kumar, et al. (2005). "Study of the occurrence of *Vibrio vulnificus* in oysters in India by polymerase chain reaction (PCR) and heterogeneity among *V. vulnificus* by randomly amplified polymorphic DNA PCR and *gyrB* sequence analysis." Environ Microbiol **7**(7): 995-1002.
- Raimondi, F., J. P. Kao, et al. (2000). "Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in in vitro systems." Infect Immun **68**(6): 3180-5.
- Remacle, J., N. Zammattéo, et al. (1994). "Les sondes à ADN, outils du futur." Biofutur.
- Shangkuan, Y. H., Y. S. Show, et al. (1995). "Multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* and to biotype *Vibrio cholerae* O1 (Abstract)." J Appl Bacteriol **79**(3): 264-73.
- Simpson, L. M. and J. D. Oliver (1983). "Siderophore production by *Vibrio vulnificus*." Infect Immun **41**(2): 644-9.
- Skalhegg, B. S. and K. Tasken (2000). "Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA." Front Biosci **5**: D678-93.
- van Asbeck, B. S., J. J. Marx, et al. (1984). "Functional defects in phagocytic cells from patients with iron overload." J Infect **8**(3): 232-40.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature **171**(4356): 737-8.
- Wen, W. H., L. Bernstein, et al. (2000). "Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis." Cancer Res **60**(10): 2716-22.
- Wolcott, M. J. (1992). "Advances in nucleic acid-based detection methods." Clin Microbiol Rev **5**(4): 370-86.
- Wright, A. C. and J. G. Morris, Jr. (1991). "The extracellular cytotoxin of *Vibrio vulnificus*: inactivation and relationship to virulence in mice." Infect Immun **59**(1): 192-7.
- Yeung, P. S. and K. J. Boor (2004). "Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections." Foodborne Pathog Dis **1**(2): 74-88.
- Zammattéo, N., S. Hamels, et al. (2002). "New chips for molecular biology and diagnostics." Biotechnol Annu Rev **8**: 85-101.
- Zammattéo, N., L. Jeanmart, et al. (2000). "Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays." Anal Biochem **280**(1): 143-50.
- Zammattéo, N., L. Lockman, et al. (2002 (2)). "DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes." Clin Chem **48**(1): 25-34.